

# Untersuchung der Translationsdynamik von Wasser in Proteinmatrizen mit Hilfe von Feldgradienten-NMR

Vom Fachbereich Physik der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Phys. Markus Rosenstihl

aus

Donaueschingen

Darmstadt, 2012

D17

Referent: Prof. Dr. Michael Vogel  
Koreferent: Prof. Dr. Franz Fajara

Tag der Einreichung: 5.4.2012  
Tag der Prüfung: 25.4.2012

# Erklärung zur Dissertation

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation ohne Hilfe Dritter nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Darmstadt, den 5.4.2012

---

Markus Rosenstihl



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2. Kenntnisstand zum Wasser/Protein-System</b>	<b>13</b>
2.1. Glasbildner . . . . .	13
2.2. Unterkühltes Wasser und der Fragil-Stark-Übergang . . . . .	17
2.3. Dynamischer Übergang des Proteins . . . . .	19
2.4. Diffusionsmessungen für Wasser an Proteinen . . . . .	21
<b>3. Grundlagen und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1. Kernmagnetische Resonanz . . . . .	23
3.2. Relaxation in der NMR . . . . .	25
3.2.1. Relaxation durch Dipol-Dipol Wechselwirkung . . . . .	25
3.3. Pulssequenzen . . . . .	28
3.3.1. FID . . . . .	29
3.3.2. Saturation-Recovery-Experiment . . . . .	29
3.3.3. Hahn-Echo-Experiment . . . . .	30
3.3.4. Stimuliertes-Echo-Experiment . . . . .	31
3.4. Diffusion . . . . .	32
3.4.1. Feldgradienten-NMR . . . . .	36
3.4.2. Experimente zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten . . . . .	39
3.4.3. Vergleich von statischer mit gepulster Feldgradienten NMR . . . . .	41
3.5. Diffusion unter Einfluss von Kreuzrelaxation . . . . .	44
3.6. Residuelle Dipolkopplung . . . . .	51
3.7. Apparate und Proben . . . . .	51
3.7.1. Proben . . . . .	51
3.7.2. Spektrometer . . . . .	54
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>59</b>
4.1. Myoglobin und Wasser . . . . .	59
4.1.1. PFG-STE-Experimente an M35 . . . . .	71
4.2. Lysozym und Wasser . . . . .	74
4.3. Kritik an veröffentlichten Daten . . . . .	80
4.4. Vergleich mit Resultaten für lokale Wasserdynamik . . . . .	82
<b>5. Zusammenfassung/Summary</b>	<b>87</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>95</b>
A.1. Tabelle der Aminosäuren . . . . .	95

A.2. Numerische Integration der gekoppelten Differentialgleichung des Modells von Peschier . . . . .	96
A.3. Tabellierte Diffusionskoeffizienten . . . . .	98
A.4. Elastinprobe E30 . . . . .	99
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>

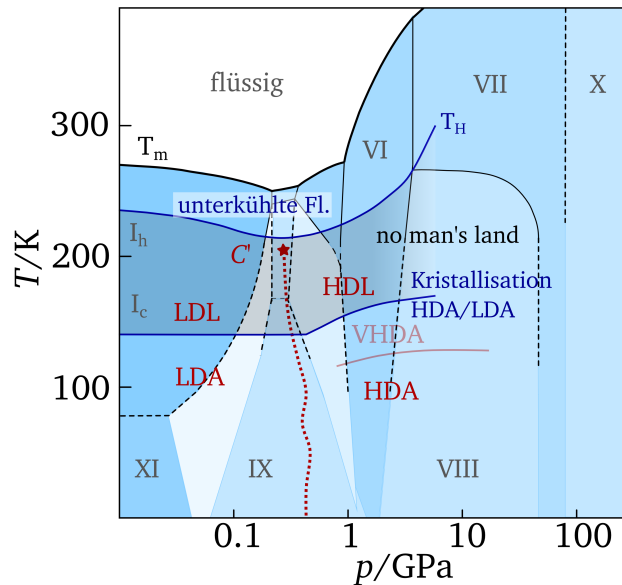
# 1. Einleitung

Wasser ist die wichtigste Flüssigkeit auf der Erde. Wasser ist existenziell für das Leben und es wirkt als Moderator für das Klima der Erde. Trotz langjähriger Forschung sind jedoch immer noch nicht alle Besonderheiten und Anomalien des Wassers verstanden<sup>[1]</sup>. Es existiert z.B. kein einziges Modell für Computersimulationen, welches das Verhalten von Wasser inklusive der Anomalien korrekt nachbildet.

Die wohl bekannteste Anomalie des Wassers ist das Maximum der Dichte bei 4 °C und wurde schon 1708 beschrieben<sup>[2]</sup>. Eine Konsequenz dieser Anomalie ist die Umkehrung des Vorzeichens des Wärmeausdehnungskoeffizienten  $\alpha_T$  bei 4 °C. Wasser besitzt ein Minimum in der isothermen Kompressibilität bei ca. 46 °C. Weitere Anomalien sind das Minimum der Wärmekapazität bei 35 °C, die hohe Oberflächenspannung, sowie die Beobachtung, dass das Dichtemaximum und der Schmelzpunkt durch Druck *erniedrigt* werden, was im Gegensatz zu einfachen Flüssigkeiten steht, bei denen Druckerhöhung zu Kristallisation, und somit zur Erhöhung der Schmelztemperatur führt<sup>[3]</sup>.

Am Rande sei noch eine weitere Kuriosität von Wasser erwähnt, der so genannte Mpemba-Effekt<sup>[4]</sup>: Heißes Wasser gefriert manchmal schneller als kaltes Wasser. Der Grund hierfür ist noch nicht verstanden, da sehr viele Parameter diesen Effekt beeinflussen. Der Effekt wurde von Mpemba 1969 bei der Herstellung von Eis wiederentdeckt<sup>[4]</sup>, war aber schon 300 Jahre v. Chr. Aristoteles bekannt und wurde in seiner *Metereologica* beschrieben. Der Mpemba-Effekt ist neuerdings wieder Gegenstand der Forschung<sup>[5-8]</sup>.

Wenn Wasser gefriert, ergibt sich eine noch komplexere Situation. Festes Wasser ist für seinen Polymorphismus bekannt, d.h. es gibt mehrere amorphe und kristalline Eisphasen. Bekannt sind mindestens drei (metastabile) amorphe Eise, das so genannte LDA (Low Density Amorphous) Eis, HDA (High Density Amorphous) Eis und VHDA (Very High Density Amorphous) Eis, sowie momentan weitere 16 kristalline Hochdruck-Eisphasen, benannt mit römischen Ziffern in der Reihenfolge ihrer Entdeckung I<sub>h</sub>, I<sub>c</sub> bis



**Abb. 1.1.:** Phasendiagramm von Wasser in Abhängigkeit von Druck  $p$  und Temperatur  $T$ .  $T_m$  ist die Schmelztemperatur, welche die Temperatur des Fest-Flüssig-Phasenübergangs beschreibt. Der unterkühlbare Bereich ist begrenzt durch die homogene Nukleationstemperatur  $T_H$  und markiert den Anfang des „no man's land“ (schattiert), in dem Wasser nur in kristalliner Form experimentell zugänglich ist. Die amorphen Eise LDA und HDA kristallisieren bei ca. 150 K zu kubischem Eis  $I_c$ , was die untere Grenze des „no man's land“ ergibt. Die gestrichelte Linie deutet den Verlauf des postulierten Phasenübergangs HDA/LDA bzw. HDL/LDL an und endet in einem zweiten kritischen Punkt  $C'$ .

XV. Ein Teil dieser Eisphasen ist im Phasendiagramm des Wassers (Abb. 1.1) dargestellt. Während auf der Erde Eis in der hexagonalen Eisphase  $I_h$ , und in geringerem Maße in der kubischen Phase  $I_c$  vorliegt, sind die weiteren kristallinen Eisphasen von großer Bedeutung in der Astronomie. Auf dem Jupitermond Europa wird z.B. ein flüssiger Ozean unter einer 10–30 km dicken Eisschicht vermutet<sup>[9]</sup>. Der Druckverlauf auf dem Jupitermond könnte es dem Phasendiagramm von Wasser nach (Abb. 1.1) erlauben einen Ozean von flüssigem Wasser zwischen zwei Eisschichten vorzufinden. Eine neue Veröffentlichung postuliert sogar die Existenz kleiner Seen nur 3 km unterhalb der Oberfläche. Das Wasser dieser Seen könne sich zudem noch mit dem Wasser des tiefer liegenden Ozeans austauschen<sup>[10]</sup>.

Wird eine Flüssigkeit auf Temperaturen unterhalb ihres Gefrierpunktes gekühlt, so spricht man von einer *unterkühlten* Flüssigkeit, sofern die Kristallisation ausbleibt. Durch Fluktuationen der lokalen Dichte und des Drucks aufgrund thermischer Bewegung können sich Kristallisationskeime mit zufälliger Anzahl an Molekülen bilden. Bei Überschreiten einer kritischen Größe zerfällt der Keim nicht wieder, sondern es



---

lagern sich weitere Moleküle aus der Flüssigphase an, bis keine Moleküle mehr in der Flüssigphase vorhanden sind. Dieser Vorgang wird *homogene Nukleation* genannt. Bei Temperaturen oberhalb der Schmelztemperatur  $T_m$  ist das chemische Potential des Moleküls in der Flüssigkeit größer als im Festkörper,  $\mu_{\text{fl}} > \mu_{\text{fest}}$ , während es sich unterhalb  $T_m$  umgekehrt verhält. Die kritische Größe der Kristallisationskeime nimmt dabei unterhalb  $T_m$  mit fallender Temperatur ab. Praktisch ergibt sich hierdurch eine tiefste Temperatur  $T_H$ , ab der Kristallisation nicht mehr vermeidbar ist. Wasser hat bei Normaldruck eine homogene Nukleationstemperatur von  $T_H \approx 236 \text{ K}$ <sup>[11–13]</sup>.

Das Verhalten von Wasser beim Übergang vom unterkühlten Zustand zu einem seiner amorphen Zustände ist Gegenstand aktueller Forschung. Besonders diskutiert wird die Existenz eines zweiten kritischen Punktes  $C'$  bei  $T \approx 200 \text{ K}$  und  $p \approx 100 \text{ MPa}$ <sup>[14]</sup>, der das Ende eines Phasenübergangs zwischen HDA und LDA darstellen soll. Die experimentelle Verifikation dieser These gestaltet sich schwierig. Zum Einen kristallisiert Wasser bei Abkühlung durch homogene Nukleation bei  $T_H = 236 \text{ K}$ , zum Anderen kristallisieren die amorphen Eise LDA und HDA bei  $150 \text{ K}$  beim Aufheizen. Dazwischen liegt ein Bereich, in dem nur kristallines Bulkwasser vorliegt, das sogenannte „no man’s land“. Genau innerhalb dieses „no man’s land“ wird der zweite kritische Punkt  $C'$  vermutet. Ebenfalls im unzugänglichen Bereich liegen die postulierten Flüssigphasen von LDA und HDA, die „low density liquid“ (LDL), beziehungsweise die „high density liquid“ (HDL) Phase (Abb. 1.1). Die Phasen sind dabei durch einen Phasenübergang erster Ordnung getrennt, der in einem zweiten kritischen Punkt  $C'$  enden soll<sup>[15,16]</sup>.

In vielen Systemen lässt sich Kristallisation vermeiden, indem schnell genug abkühlt wird. Auch lässt sich homogene Nukleation vermeiden, indem Wasser im Confinement bzw. eingeschränkten Geometrien betrachtet wird. Dabei gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten. Sowohl bei Wasser in Nanoröhren (hartes Confinement), Wasser in Mikroemulsionen (weiches Confinement) als auch Wasser in Proteinmatrizen. In jedem dieser Systeme wird Kristallisation vermieden, sofern der Wasseranteil nicht zu hoch ist. Man versucht mit diesen Systemen Einblick in das Verhalten von Wasser im „no man’s land“ zu gewinnen. Dabei gibt es allerdings zu beachten, dass die Art des Confinements, z.B. hart oder weich, hydrophile oder hydrophobe Grenzschicht, einen starken Einfluss auf die Dynamik und Struktur des eingeschlossenen Mediums haben kann<sup>[17]</sup>.

### Der Glasübergang

Unterkühlt man eine Flüssigkeit und bleibt die Kristallisation aus, so spricht man von einem Glas, wenn die charakteristische Zeitkonstante für Änderungen in der Struktur mehr als 100 s beträgt. Die Temperatur, bei der diese Zeit 100 s beträgt, definiert man als Glasübergangstemperatur  $T_g$ .

Glas an sich ist schon lange bekannt. In der Frühzeit der menschlichen Geschichte nur als natürlich vorkommender Obsidian, der durch schnelles Abkühlen von stark  $\text{SiO}_2$ -haltiger Lava entsteht, oder auch als Fulgurit, entstanden durch Blitzeinschlag in sandigem Boden. Zu den natürlichen Gläsern zählen zudem noch das Impaktglas und die so genannten Tektite, die beide beim Einschlag eines Meteoriten entstehen.

texture appears. Perhaps all homogeneous bodies, in their transition from a fluid to a solid state, would, if this transition were not effected too hastily, concrete into crystals, or bodies similarly figured. Instances of such crystallization have occurred to me in glass, which had passed very slowly from a fluid to a solid state; and the form, regularity, and size of these vitreous crystals have varied according to the circumstances with which their concretion had been accompanied. I send along with this paper a few specimens of this crystallized glass, together with a drawing of some of the most remarkable crystals.

**Abb. 1.2.:** Der Glasübergang war schon im 18ten Jhdt. Gegenstand der Forschung. Die Bedeutung der Abkühlrate wurde z.B. schon 1776 von Keir und Fordyce<sup>[18]</sup> beschrieben.

Die Ägypter stellten Glas ab ca. 3500 v. Chr. großtechnisch her<sup>[19]</sup>. Der Übergang einer Flüssigkeit zum Glas war auch schon im 18. Jhdt. Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen (Keir und Fordyce<sup>[18]</sup>, Abb. 1.2). Die Struktur eines Glases unterscheidet sich dabei kaum von der Struktur einer Flüssigkeit. Damit ist die Struktur von Glas nicht langreichweitig geordnet wie bei einem Kristall, sondern die Ordnung ist auf die nächsten Nachbarn beschränkt. Ein Glas kann dabei, je nach Herstellungsprozess, inneren Spannungen

ausgesetzt sein, die so stark sind, das selbst kleinste Stöße das Glas zum Bersten bringen. Es wurde schon früh (siehe z.B.<sup>[20]</sup> aus dem Jahr 1744) erkannt, dass durch Wiederaufheizen des Glases diese Spannungen abgebaut werden können. Dieser Prozess wird als „Annealing“ bezeichnet. Durch das Aufheizen werden im Glas durch Umordnung der Struktur die Spannungen abgebaut. Dieser Prozess ist wichtig und muss im Hinblick auf die Lagerung und das Vermessen von Gläsern im Labor berücksichtigt werden. Besonders starkes und/oder zu häufiges Aufheizen kann zur Kristallisation der Probe führen. Es kann auch passieren, dass eine Probe nach einigen Jahren kristallisiert ist, das sogenannte „Aging“<sup>[21]</sup>.

Oberhalb der Glasübergangstemperatur  $T_g$  spricht man von glasbildenden Flüssigkeiten. Anhand des Temperaturverlaufs der Viskosität  $\eta$  unterscheidet man dabei zwei Arten von Glasbildnern. Die starken Glasbildner folgen einem Arrhenius-Verlauf, während die fragilen Glasbildner ein Vogel-Fulcher-Tammann-Verhalten zeigen (siehe Abb. 1.3).

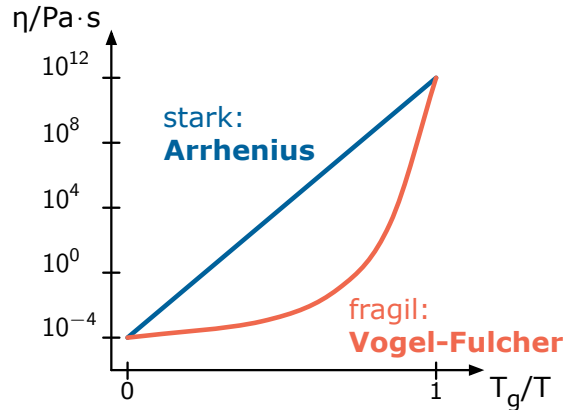
Daten von Wasser aus thermodynamischen

Experimenten weisen nahe des Schmelzpunktes  $T_m$  ein fragiles Verhalten auf, während bei kinetischen Messungen in der Nähe der Glasübergangstemperatur  $T_g$  ein starkes Verhalten zu beobachten ist. Als Lösung für diesen Widerspruch schlugen Angell et al. einen Fragil-Stark-Übergang (Fragile-to-Strong Transition, FST) bei 220 K vor<sup>[22,23]</sup>. Demgegenüber steht die Interpretation von Stanley et al., die das fragile Verhalten der HDL-Phase, und das starke Verhalten der LDL-Phase zuordnen. Nach diesen Autoren wäre die Existenz eines Fragil-Stark-Übergangs ein Beweis für

die Existenz eines zweiten kritischen Punktes  $C'$ <sup>[16,24]</sup>. Die meisten Veröffentlichungen über den Fragil-Stark-Übergang wurden mit Methoden durchgeführt, die nur die lokale Umgebung auf atomarer Längenskala betrachten. Als Beweis für einen FST werden Neutronenstreudaten von Chen et al.<sup>[25]</sup> genannt, die jedoch stark kritisiert werden<sup>[26–28]</sup>. Doster et al. schlagen eine verbesserte Methode zur Auswertung vor, nach welcher der FST *nicht* beobachtet wird.

Zwei Veröffentlichungen<sup>[29,30]</sup>, die nicht-lokale Methoden verwenden, finden allerdings einen mutmaßlichen FST für Wasser in Confinement<sup>[29]</sup> sowie Wasser in einer Proteinmatrix<sup>[30]</sup>. Auf die Aussagekraft dieser Untersuchungen wird im Laufe der Arbeit noch im Detail eingegangen.

Generell ist das Studium der Dynamik von Wasser in Proteinmatrizen nicht nur für das Verständnis von unterkühltem Wasser von großer Bedeutung, sondern auch für das Verständnis der Funktion der Proteine. Das Zusammenspiel zwischen dem Wasser der Hydratationshülle und dem Protein ist Gegenstand aktueller Forschung<sup>[31–39]</sup>.



**Abb. 1.3.:** Die Temperaturabhängigkeit der Viskosität von Glasbildnern. Es zwischen einem Arrhenius- bzw. Vogel-Fulcher-Tammann-Verhalten unterschieden.

### **Ziele der vorliegenden Arbeit**

Diese Arbeit befasst sich mit der *langreichweitigen* Translationsdynamik von Wassermolekülen in Proteinmatrizen unter Verwendung der statischen und gepulsten Feldgradienten-Kernspinresonanz (Static/Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance, SFG-NMR/PFG-NMR) um Aussagen über die Existenz eines Fragil-Stark-Übergang von Wasser in Proteinmatrizen treffen zu können. Ein wesentlicher Bestandteil ist hierbei die Bestimmung des Informationsgehalts von SFG- und PFG-NMR-Diffusionsmessungen an Mischsystemen, die aus Komponenten unterschiedlicher Beweglichkeit bestehen. Es zeigt sich, dass es spezielle Effekte gibt, welche bei der Auswertung und Interpretation von Messungen zu berücksichtigen sind.

Zuerst wird ein Überblick über den Kenntnisstand zum System gegeben, sowie die verschiedenen Thesen und Modelle, welche Wasser in unterkühltem Zustand betreffen, vorgestellt. Danach wird die für die Messungen relevante Theorie der kernmagnetischen Resonanz (NMR) eingeführt. Im Kapitel „Apparate und Proben“ werden Details zu den verwendeten Proben und zur Technik der verwendeten Apparate erläutert. Im weiteren Verlauf werden die Messergebnisse und deren Interpretation dargestellt und im Vergleich zur Literatur bewertet.

## 2. Kenntnisstand zum Wasser/Protein-System

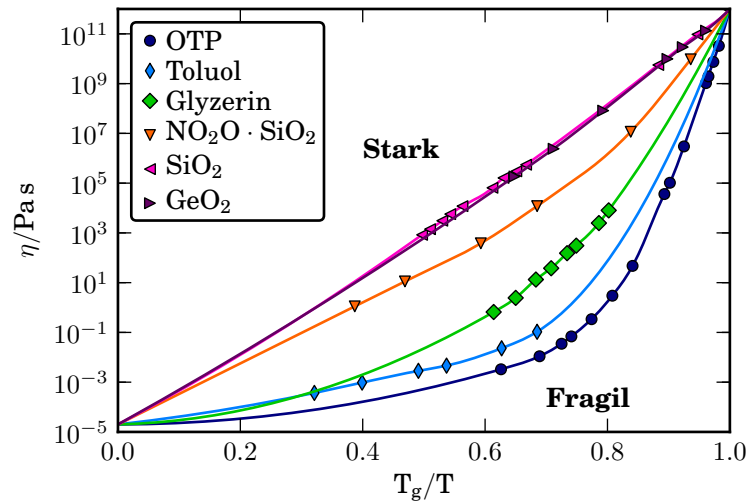
In der Literatur wird seit der Veröffentlichung der Theorie von Mishima und Stanley<sup>[24]</sup> nach einem experimentellen Nachweis für oder gegen einen Fragil-Stark-Übergang von Wasser gesucht. Die meisten Experimente konzentrieren sich dabei auf lokale Methoden wie z.B. dielektrische Spektroskopie oder Neutronenstreuung. Da der vermutete Fragil-Stark-Übergang für Bulkwasser in einem aufgrund von Kristallisation experimentell nicht zugänglichen Bereich liegt, wird häufig die Dynamik von Wasser in eingeschränkten Geometrien untersucht. Es hat sich gezeigt, dass für Wasser in so „Confinement“ bis tief unter dem Gefrierpunkt von Bulkwasser Kristallisation vermieden wird.

Zunächst folgt eine kurze Übersicht über die generellen Eigenschaften glasbildender Systeme. Danach wird näher auf die Eigenschaften von unterkühltem Wasser und den vermeintlichen Fragil-Stark-Übergang eingegangen. Am Ende dieses Kapitels folgt noch eine Übersicht über die in der Literatur veröffentlichten Daten zum Wasser/Protein-System.

### 2.1. Glasbildner

Ein charakteristisches Merkmal von glasbildenden Flüssigkeiten ist die starke Zunahme der Viskosität bei sinkender Temperatur. Dabei beobachtet man für manche glasbildenden Systemen eine Zunahme der Temperaturabhängigkeit (siehe Abb. 2.1). Wie erwähnt unterscheidet man dabei zwischen den starken und fragilen Glasbildnern. Die starken Glasbildner zeigen einen Arrhenius-Verlauf der Viskosität:

$$\eta = \eta_0 \exp \left( \frac{E_A}{R \cdot T} \right), \quad (2.1)$$



**Abb. 2.1.:** Viskosität einiger fragiler und starker Glasbildner aufgetragen über  $T_g/T$ <sup>[40]</sup>. Durchgezogene Linien dienen der optischen Führung.

mit der Aktivierungsenergie  $E_A$  in J/mol und der molaren Gaskonstante  $R = 8.314 \text{ J}/(\text{mol K})$ , d.h. der Verlauf ist linear in der Auftragung  $\log \eta$  vs.  $1/T$  (sog. Arrhenius-Darstellung). Starke Glasbildner sind z.B.  $\text{SiO}_2$  und  $\text{GeO}_2$ . Der Grund dafür liegt in der Netzwerkstruktur dieser Glasbildner.

Die fragilen Glasbildner dagegen zeigen ein Super-Arrhenius-Verhalten, welches mit der Vogel-Fulcher-Tammann (VFT) Gleichung<sup>[41–43]</sup> empirisch beschrieben werden kann:

$$\eta = \eta_0 \exp \left[ B / (T - T_0) \right]. \quad (2.2)$$

Hier sind besonders ortho-Terphenyl (OTP) und Toluol als Vertreter der fragilen Glasbildner zu nennen. Es scheint, dass Stoffe mit van-der-Waals-Bindungen oft fragile Glasbildner sind.

Experimentell beobachtet man beim Aufheizen eines Glasbildners einen Sprung der Wärmekapazität  $C_p$  aufgrund von zusätzlichen Freiheitsgraden die verfügbar werden. Dieses charakteristische Merkmal wird zur Bestimmung der Glasübergangstemperatur bei der DSC (Differential Scanning Calorimetry) verwendet. Ein Temperaturbereich wird mit einer festgelegten Heizrate, in der Regel  $10 \text{ K/min}$ , durchfahren. Dabei wird die zugeführte Wärmeenergie gemessen und mit einer Referenzprobe verglichen, wodurch auf die Wärmekapazität geschlossen werden kann. Bei fragilen Glasbildnern ist dabei eine relativ scharfe (wenige K breite) Stufe in  $C_p$  zu beobachten, während bei starken

Glasbildnern diese Stufe bis zu 100 K breit ist.

Die Glasübergangstemperatur  $T_g$  ist eine *kinetische* Größe die beschreibt, bei welcher Temperatur die Zeitkonstante der Strukturrelaxation 100 s (DIN 53765) oder die Viskosität  $10^{12}$  Pa s beträgt. Da der Glasübergang ein kinetischer Effekt ist, hängt  $T_g$  von der Kühlrate ab: Je höher die Kühlrate, desto höher ist  $T_g$ . Der Grund hierfür ist darin zu sehen, dass dem System bei hohen Kühlraten keine Zeit zur Relaxation seiner Struktur gegeben wird. Dadurch ist das Glas nicht mehr im thermischen Gleichgewicht.

Die mikroskopische Ursache des Glasübergangs, des Übergangs einer viskosen Flüssigkeit zu einem Glas, ist ein ungelöstes Rätsel der Physik. Es gibt verschiedene Theorien, die diesen Anstieg der Viskosität bzw. Relaxationszeit und den Sprung in der Wärmekapazität erklären wollen.

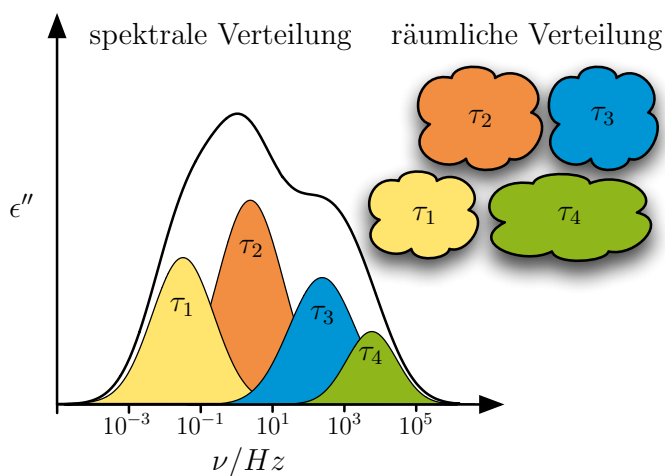
Viele Eigenschaften von Gläsern können qualitativ mit dem Modell einer Energielandschaft erklärt werden<sup>[44–46]</sup>. Diese Energielandschaft besitzt viele lokale Minima. Bei schneller Abkühlung kann das System nicht seine niedrigste energetische Konformation, die geordnete Kristallstruktur, erreichen.

Die Adam-Gibbs-Theorie<sup>[47]</sup> stellt eine Verbindung zwischen dem Temperaturverlauf der Relaxationszeit, und dem Verlauf der Konfigurationsentropie her. Die Gesamtentropie  $S$  des Systems wird dabei als Summe von zwei Teilen aufgefasst. Zum Einen die Entropie der Vibrationen,  $S_{vib}$ , und zum Anderen die Konfigurationsentropie  $S_{con}$ . Dies entspricht der Idee der Existenz einer Energielandschaft, bei der das System um ein Minimum der potentiellen Energie vibriert, um dann hin und wieder durch thermisch aktivierte Sprünge in ein neues Minimum zu gelangen. Eine Konfigurationsänderung eines Subensembles ist eine *kooperative* Umordnung der beteiligten Moleküle. Die Aktivierungsenergie einer regionalen Konfigurationsänderung ist dabei proportional zum Volumen der betroffenen Region und die Wechselwirkung des Subensembles mit dem Gesamtsystem ist schwach. Die Überschussentropie  $S_{exc}$  einer unterkühlten Flüssigkeit, d.h. die Differenz der Entropie der Flüssigkeit  $S_{fl}$  zur Entropie  $S_{cryst}$  des Kristalls, wird gleichgesetzt mit der Konfigurationsentropie  $S_{con}$ ,  $S_{exc} \simeq S_{con}$ . Das Adam-Gibbs-Modell sagt dann einen Phasenübergang zu einem Zustand mit  $S_{con} = 0$  mit einer unendlichen Relaxationszeit voraus. Das Modell begründet somit den starken Anstieg der Relaxationszeit bei Annäherung an die Glasübergangstemperatur  $T_g$  mit einer Annäherung an diesen Phasenübergang.

Die Modenkopplungstheorie (MCT)<sup>[48–51]</sup> beschreibt den Glasübergang als *kinetischen*

Effekt. Moleküle befinden sich in einem Käfig gebildet von seinen Nachbarn. Das Molekül innerhalb eines Käfigs führt Vibrationen aus. Gelegentlich gelangt es durch Sprünge in eine neue Umgebung. Die Vibration des Moleküls in seinem Käfig entspricht einem schnellen Relaxationsprozess, die Sprünge in eine neue Umgebung einem langsamen Relaxationsprozess.

Die Temperatur, bei der ein Übergang vom Gleichgewichtszustand in den Nichtgleichgewichtszustand stattfindet, ist die Glasübergangstemperatur  $T_g$ . Der Glaszustand ist damit *kein* Gleichgewichtszustand, d.h. das Glas ist nicht ergodisch!



**Abb. 2.2.:** Räumlich heterogene Dynamik in unterkühlten Flüssigkeiten. Es gibt räumliche Bereiche, die sich hinsichtlich ihrer Dynamik unterscheiden<sup>[52]</sup>.

zeit beim Maximum  $\tau_\alpha \approx 1/\nu$  beträgt. In der Regel lässt sich die Temperaturabhängigkeit von  $\tau_\alpha$  mit dem VFT-Gesetz (2.2) beschreiben. Der Prozess der Strukturrelaxation ist dabei ein kooperativer Prozess der beteiligten Moleküle, der bei  $T_g$  einfriert.

Johari und Goldstein fanden mittels dielektrischer Spektroskopie<sup>[53]</sup> noch einen zweiten Prozess. Der Johari-Goldstein-(JG-)- $\beta$ -Prozess beschreibt lokale Änderungen und findet unterhalb  $T_g$  noch statt. Der Johari-Goldstein- $\beta$ -Prozess ist zumeist auf kleinwinklige Reorientierungen zurückzuführen<sup>[54]</sup> und lässt sich zumindest bei  $T < T_g$  durch ein Arrhenius-Gesetz beschreiben.

Bei ungeordneten Materialien, wie den viskosen Glasbildnern, beobachtet man in der

Glasbildende Systeme werden häufig durch dielektrische Spektroskopie (Dielectric Spectroscopy, DS) charakterisiert. Dabei wird der dielektrische Verlust  $\epsilon''$  des Systems auf eine Anregung mit einer bestimmten Frequenz gemessen. Trägt man den dielektrischen Verlust über der Frequenz  $\nu$  auf, so erhält man oft eine Kurve mit zwei oder mehr Maxima. Die Maxima werden dabei der Reihe nach als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, etc. Relaxationsprozesse bezeichnet. Das erste Maximum beschreibt meist die Strukturrelaxation, deren Korrelations-



Regel im Experiment einen gestreckt-exponentiellen Verlauf der Strukturrelaxation:

$$\exp \left[ - \left( \frac{t}{\tau_\alpha} \right)^\beta \right] \quad (2.3)$$

Anhand von Zwei-Zeiten-Korrelationsfunktionen kann man nicht unterscheiden, ob an jedem Ort im Material der gleiche zeitliche Verlauf der Relaxation herrscht (homogene Dynamik) oder ob das gemessene Ensemblemittel auf unterschiedliche exponentielle Relaxationsprozesse (heterogene Dynamik) zurückzuführen ist<sup>[52]</sup>. Komplexere Experimente haben gezeigt, dass Regionen in der unterkühlten Flüssigkeit existieren, in denen sich die Zeitkonstante der Strukturrelaxation um Größenordnungen von der durchschnittlichen Relaxationszeit unterscheidet (siehe Abb. 2.2). Als Verteilung wird oft eine so genannte Cole-Davidson-Verteilung von Korrelationszeiten angenommen<sup>[55,56]</sup>.

## 2.2. Unterkühltes Wasser und der Fragil-Stark-Übergang

Die experimentelle Erforschung der postulierten Flüssigphasen LDL und HDL im Bulkwasser ist *nicht* möglich, da Wasser unter  $T_H=236\text{ K}$  immer durch homogene Nukleation gefriert. Durch Erwärmen der amorphen Eise HDA/LDA erreicht man ebenfalls nicht die LDL/HDL Phasen, da LDA und HDA ab ca.  $T_X=150\text{ K}$  zu kubischem Eis  $I_c$  kristallisieren. Dazwischen ist das sogenannte „no man’s land“.

Zur Beschreibung der Eigenschaften von unterkühltem Wasser werden verschiedene Modelle und Hypothesen angenommen, welche hier kurz zusammengefasst werden sollen.

**Singularity Free Szenario:** Im „Singularity Free Szenario“ von Sastry et al.<sup>[46,57]</sup> ist der Übergang von LDL zu HDL kontinuierlich und findet in einem endlichen Temperatur- und Druckbereich statt. Es wird keine Koexistenz der Phasen im thermischen Gleichgewicht vorhergesagt.

**Critical Point Free Szenario:** Das "Critical Point Free Szenario" von Angell postuliert einen Ordnungs-Unordnungs-Übergang<sup>[22,23]</sup>. Dabei wird angenommen, dass das

Wasser bei Abkühlung kontinuierlich von einer fragilen Flüssigkeit zu einer starken Flüssigkeit umgewandelt wird<sup>[23]</sup>. Hinweise auf ein solches Verhalten ergeben sich aus DSC Messungen an Wasser in Nanoconfinement<sup>[23]</sup>. Mit Hilfe dieser Hypothese soll die unterschiedliche Fragilität von schwach und stark unterkühltem Wasser erklärt werden. Nahe  $T_g$  ist Wasser ein starker Glasbildner, während Wasser beim Schmelzpunkt  $T_m$  fragiles Verhalten aufweist. Als besonders starken Hinweis nennt Angell PFG-NMR Diffusionsmessungen von Mallamace et al.<sup>[29]</sup> an Wasser in MCM-41 Poren mit einem Durchmesser von 2.4 nm. Auf die Aussagekraft dieser Ergebnisse wird im Laufe dieser Arbeit noch im Detail eingegangen.

**2nd Critical Point Scenario:** Liu et al.<sup>[15,16]</sup> schlagen das „2nd Critical Point Scenario“ vor: HDA und LDA werden dabei als feste Glaszustände der zugehörigen postulierten Flüssigkeitsphasen HDL (High Density Liquid) bzw. LDL (Low Density Liquid) angesehen. Zwischen den Phasen existiert ein Phasenübergang 1. Ordnung der in einem zweiten kritischen Punkt endet, siehe Abb. 1.1. Die Fortführung dieser Koexistenzlinie ist die sog. „Widomline“ bei der die Wärmekapazität  $C_p$  maximal ist. Molekulardynamische (MD) Simulationen von Wasser finden einen zweiten kritischen Punkt, bzw. einen flüssig-flüssig Phasenübergang für verschiedene Wassermodelle (TIP5P, ST2, Jagla)<sup>[16]</sup>. Dieser zweite kritische Punkt soll die Ursache für den experimentell beobachteten Fragil-Stark-Übergang sein<sup>[58]</sup>.

Chandler et al. weisen aber auf mehrere Probleme bei diesen MD Simulationen hin<sup>[59]</sup>. Einerseits sind in der Regel die simulierten Zeitskalen zu kurz, andererseits sind die Systeme relativ klein. Weiterhin steht kein Ordnungsparameter zur Verfügung, der zwischen Ordnung und Unordnung unterscheiden kann und schließlich abstrahieren die Modelle zu viel von der tatsächlichen Wechselwirkung, um die Simulationsdauer zu optimieren. Stattdessen argumentieren die Autoren, dass es sich bei dem vermuteten flüssig-flüssig Phasenübergang in Wirklichkeit um einen flüssig-fest Phasenübergang 1. Ordnung handelt.

**Kein FST von Hydratationswasser:** Kein Fragil-Stark-Übergang wird hingegen zum Beispiel von Gainaru<sup>[60]</sup>, Lusceac<sup>[37,39,61]</sup>, Vogel<sup>[28]</sup>, Rosenstihl<sup>[28]</sup> und Pawlus<sup>[62]</sup> gefunden.

Swenson et al.<sup>[63]</sup> finden zwar anhand von DS-Daten eine Änderung der Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeit bei einer Temperatur  $T_x$ , führen diesen Effekt jedoch

auf die Existenz *unterschiedlicher* unterliegenden Prozesse. Der Arrhenius-Verlauf unterhalb  $T_x$  wird auf einen  $\beta$ -Prozess zurückgeführt, während der  $\alpha$ -Prozess oberhalb  $T_x$  dominiert.<sup>2</sup>H-NMR Messungen an hydratisiertem Kollagen und Elastin<sup>[28]</sup> zeigen einen großwinkligen Sprungmechanismus der Wasserdynamik bei hinreichend tiefen Temperaturen.

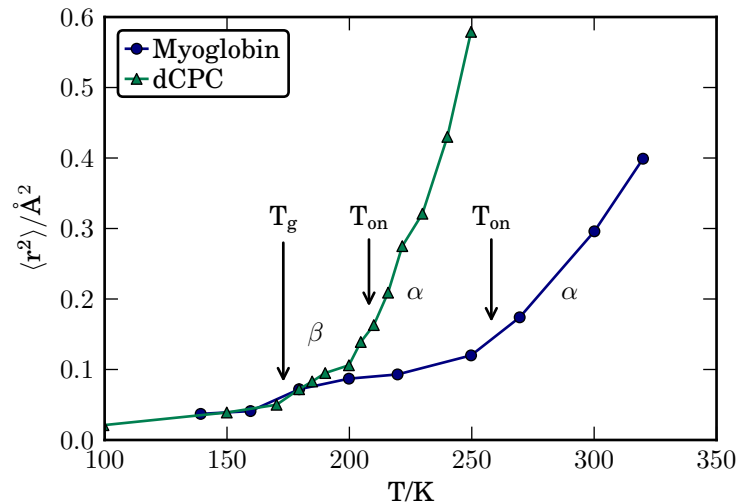
## 2.3. Dynamischer Übergang des Proteins

Bei Neutronenstreuung an hydratisierten Proteinen findet man bei Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrats (MSD)  $\langle r^2 \rangle$  gegenüber der Temperatur bei ca. 220 K einen „Knick“ im Temperaturverlauf (siehe Abb. 2.3). Dieser Effekt wird auf einen dynamischen Übergang des Proteins zurückgeführt<sup>[64,65]</sup>.

Der dynamische Übergang des Proteins ist deshalb von Bedeutung, weil ab dieser Temperatur die meisten Proteine ihre biologische Funktion wahrnehmen. An *dehydrierten* Proteinen lässt sich kein dynamischer Übergang feststellen, was den Schluss nahelegt, dass der dynamische Übergang in irgendeiner Art und Weise mit der Dynamik der Hydratationshülle zusammenhängt bzw. davon beeinflusst wird. Hierzu sei allerdings auf Veröffentlichungen hingewiesen, die einen dynamischen Übergang bei *denaturiertem* hydratisiertem Protein beobachten<sup>[66,67]</sup>. Demnach wäre die Korrelation zwischen biologischer Funktion und dynamischem Übergang nicht eindeutig.

Doster<sup>[68]</sup> bringt den dynamischen Übergang des Proteins mit dem Glaspunkt des Wassers bei 170 K in Verbindung. Da man diesen Übergang aber bei zu niedrigen Kühlraten, bzw. zu kurzen Zeiten betrachtet, beobachtet man den dynamischen Übergang des Proteins bei erhöhten Temperaturen (220 K). Die erste Komponente sind Rotationsbewegungen der Seitengruppen, welche unabhängig von der Proteinumgebung sind. Die zweite Komponente sind Schwingungsbewegungen der Residuen an der Proteinoberfläche. Diese sind an die Dynamik des Wassers gekoppelt und erfahren eine kollektive, mit dem Wasser korrelierte Bewegung. Die intermediäre Streufunktion (ISF) des Hydratwassers zeigt dabei einen zweistufigen Zerfall: Doster identifiziert die schnelle Komponente mit der schnellen *lokalen* Dynamik des Wassermoleküls und die langsame Komponente mit der langsamen Translationsbewegung entlang der Proteinoberfläche. Die temperaturabhängige intermediäre Streufunktion aus Neutronenstreudaten (siehe Abb. 2.3) zeigt einen zweistufigen Verlauf. Der Beginn der ersten Stufe ist unabhängig

von der Messauflösung und markiert den  $\beta$ -Prozess, welcher den Amplitudenanstieg der Fluktuationen der Wasserstoffbrückenbindungen beschreibt. Die zweite Stufe beschreibt die Strukturrelaxation des Hydratationswassers. Die Moleküle unterliegen der langreichweitigen Diffusion entlang der Proteinoberfläche, was auch experimentell z.B. durch NMR Messungen, bestätigt wurde<sup>[34,39,61]</sup>.



**Abb. 2.3.:** Mittleres Verschiebungsquadrat aus Neutronenstreudaten von Wasserprotonen an volldeutertem C-Phycocyanin (dCPC, Kreise, Zeitauflösung: 2 ns) und Wasserprotonen an Myoglobin (Dreiecke, Zeitauflösung: 15 ps)<sup>[69]</sup>. Die Temperatur  $T_{on}$  des Beginns des langsamen  $\alpha$ -Prozesses ist abhängig von der Zeitauflösung, während die Temperatur bei der ein schneller  $\beta$ -Prozess beobachtet wird unabhängig der Zeitauflösung ist („2-step scenario“ von Doster<sup>[69]</sup>).  $T_g$  ist die postulierte Glasübergangstemperatur des Hydratationswasser bei ca. 170 K.

Chen et al.<sup>[25,30]</sup> dagegen führen den dynamischen Übergang der Proteindynamik auf einen Fragil-Stark-Übergang von LDL- zu HDL-Hydratationswasser zurück.

Eine weitere Erklärung für den beobachteten Effekt stammt von Benedetto et al.<sup>[70]</sup>: Der dynamische Übergang des Proteins ist auf die endliche Energieauflösung der Neutronenstreuung zurückzuführen. Genauer, die charakteristische Relaxationszeit des Systems schneidet die maximale Zeitauflösung der Messung.

## 2.4. Diffusionsmessungen für Wasser an Proteinen

Diffusionsmessungen für Wasser an Proteinen wurden in der Vergangenheit schon häufig durchgeführt. Dabei wurde zumeist im Raumtemperaturbereich und an Proteinen in wässriger Lösung gemessen. Als Messmethode der Wahl wurde dabei zumeist auf gepulste Feldgradienten NMR zurückgegriffen, die es erlaubt *in situ* und ohne Hilfsmittel, welche die chemische Umgebung modifizieren könnten, Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Für die Fragestellung dieser Arbeit sind allerdings hauptsächlich Messungen an Proteinen mit niedrigem Wasseranteil von Bedeutung, d.h. Protein-Wassermischungen mit einem Wassergehalt von unter 25 % Gewichtsanteil an der Gesamtmasse. Zu dem niedrigen Wassergehalt kommt noch die Bedingung hinzu, die Diffusivität des Wassers bei möglichst tiefen Temperaturen ( $T < 220\text{ K}$ ) zu bestimmen.

In einigen Veröffentlichungen zu Diffusionsmessungen von Wasser an Proteinen werden zwei diffundierende Spezies identifiziert<sup>[71–74]</sup>: Zum Einen das schnelle, bewegliche Hydrationswasser, und zum Anderen das langsame Protein. Auf die Gültigkeit dieser Annahme und die Folgen für die Auswertung wird im Laufe der Arbeit hingewiesen.

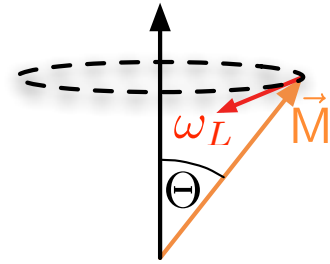
Bei der Messung und Interpretation von Daten aus PFG-NMR-Experimenten muss beachtet werden, dass es mehrere Effekte gibt, die bei Nichtbeachtung die Datenanalyse negativ beeinflussen und keine stimmige Beschreibung durch Diffusion zulassen. In der Arbeit von Edzes und Samulski<sup>[75]</sup>, und zuvor von Campbell et al.<sup>[76]</sup> und sowie Kalk et al.<sup>[77]</sup>, wurde der Effekt der Kreuzrelaxation, d.h. des gegenseitigen Austauschs von Magnetisierung der Protein- und Wasserprotonen, an einem Protein-Wasser-System mit niedrigem Hydrationsgrad systematisch untersucht. Diese Arbeit wurde später von Peschier et al.<sup>[78]</sup> aufgegriffen und um den Effekt der Diffusion *einer* Spinspezies erweitert, um Diffusionskoeffizienten von Wasser in Hydrogelen aus PFG-NMR-Experimenten zu erhalten. Eine weitere Verfeinerung der Theorie auf *zwei* diffusive Spezies, wurde später von Horstmann<sup>[79,80]</sup> veröffentlicht. In Kapitel 3.5 wird auf das Modell von Peschier in Bezug auf Diffusionsmessungen in statischen Feldgradienten näher eingegangen.



# 3. Grundlagen und Methoden

## 3.1. Kernmagnetische Resonanz

Bringt man eine Probe in ein magnetisches Feld  $\vec{B}_0$ , welches in z-Richtung zeigt, so haben die vorhandenen  $N$  Atome mit Kernspin  $I$  die Tendenz ihren Kernspin entlang des Feldes auszurichten. Die Spins präzedieren um die  $\vec{B}_0$ -Achse. Durch den Zeeman-Effekt spalten die degenerierten Energieniveaus auf, d.h. je nach magnetischer Drehimpuls-Quantenzahl  $m = -I \dots -I + 1 \dots +I$ , haben die Atome eine unterschiedliche magnetische Energie  $E_m = -m\gamma\hbar B_0$ . Dabei sind  $\gamma$  das gyromagnetische Verhältnis und  $\hbar$  die Planck'sche Konstante.



**Abb. 3.1.:** Die Magnetisierung der Probe präzediert um die Richtung des Magnetfelds mit der Frequenz  $\omega_L$

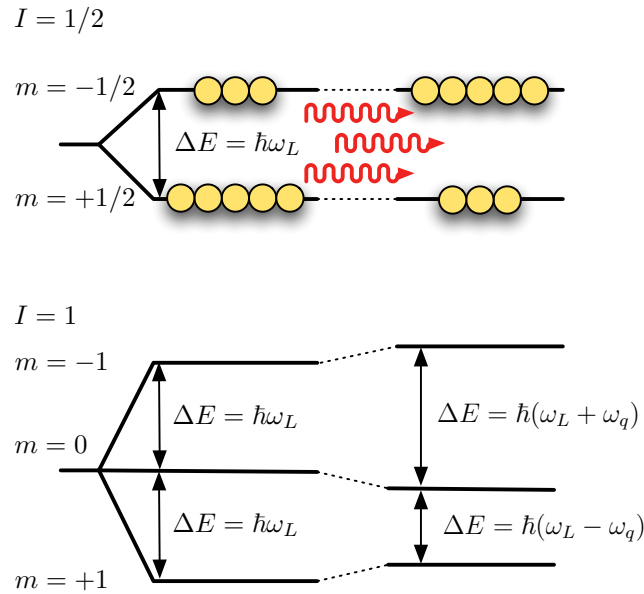
Die Gesamtmagnetisierung  $M$  lässt sich dann unter Berücksichtigung der Boltzmann-Statistik schreiben als:

$$M = \gamma\hbar N \cdot \frac{\sum_{m=-I}^I m \exp\left(-\frac{E_m}{k_B T}\right)}{\sum_{m=-I}^I \exp\left(-\frac{E_m}{k_B T}\right)} \quad (3.1)$$

Mit der Bedingung  $k_B T \gg E_m$  lässt sich Gleichung 3.1 durch Entwicklung in eine Taylor-Reihe und unter Vernachlässigung von Termen zweiter Ordnung und höher zum Curie-Gesetz vereinfachen:

$$M = \frac{N\gamma^2\hbar^2 I(I+1)}{3k_B T} B_0. \quad (3.2)$$

Man erhält also eine hohe Magnetisierung bei hohen Feldern und tiefen Temperaturen.



**Abb. 3.2.:** Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus für Spins mit  $I = 1/2$  (oben) sowie Spins mit  $I = 1$  mit zusätzlicher Quadrupol-WW (unten). Durch Einstrahlung eines geeigneten elektrischen Wechselfeldes können Übergänge zwischen den Energieniveaus angeregt werden.

Bei üblichen Temperaturen und Feldern existiert nach der Boltzmann-Statistik aufgrund der thermischen Anregung nur ein kleiner Unterschied in der Population der Energieniveaus. Man erhält für Protonen mit Spin  $I = 1/2$  ein Verhältnis der Anzahl der Spins mit  $I = -1/2$  zu  $I = +1/2$  von

$$\frac{N_{-1/2}}{N_{+1/2}} = \exp\left(-\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}\right) \approx 0.999995 \quad (3.3)$$

Dabei beträgt das gyromagnetische Verhältnis für Protonen  $\gamma = 2.675 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ T}^{-1}$ , das externe Magnetfeld  $B_0 = 7 \text{ T}$  und die Temperatur der Probe  $T = 300 \text{ K}$ . Durch Einstrahlung eines geeigneten elektrischen Wechselfeldes (RF)  $\vec{B}_1$  mit der Larmorfrequenz  $\omega_L = \gamma B_0$  senkrecht zum äußeren Magnetfeld  $\vec{B}_0$  kann man nun die Populationen der Energieniveaus manipulieren und Übergänge zwischen diesen anregen. Im thermischen Gleichgewicht zeigt die Magnetisierung der Probe  $\vec{M}$  entlang des externen Feldes  $\vec{B}_0$  und präzediert um die z-Achse mit der Larmorfrequenz  $\omega_L$ . Unter der Wirkung eines RF-Pulses wird die Magnetisierung in Richtung xy-Ebene gekippt. Der Winkel  $\Theta$  zwischen z-Achse und Magnetisierungsvektor hängt dabei von der Länge und Stärke des RF-Pulses, sowie vom gyromagnetischen Verhältnis des betrachteten Keines ab:

$$\Theta = t_p \gamma B_1 \quad (3.4)$$

Ein  $180^\circ$  Puls z.B. invertiert die Magnetisierung, während ein  $90^\circ$  Puls die Magnetisie-



rung in die xy-Ebene dreht. Da die Probe nach Einstrahlung eines Pulses nicht mehr im thermischen Gleichgewicht ist, wirken verschiedene Relaxationsprozesse die im folgenden Kapitel erläutert werden. Experimentell beobachtet man nach einem Puls einen so genannten Freien Induktionszerfall oder kurz FID (**F**ree **I**nduction **D**ecay). Der Teil der Magnetisierung in der xy-Ebene induziert ein elektrisches Signal in der RF Spule, welches einer gedämpften Schwingung mit  $\omega_L$  entspricht. Das Signal wird durch Mischung mit einer Referenzfrequenz  $\omega_{\text{ref}}$  im rotierenden Koordinatensystem beobachtet (siehe 3.17).

## 3.2. Relaxation in der NMR

Relaxation beschreibt im Allgemeinen die Rückkehr eines Systems in seinen Gleichgewichtszustand. Bei der Kernmagnetischen Resonanz (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) sind zwei Relaxationsprozesse von besonderer Bedeutung: Einerseits die Rückkehr zur Gleichgewichtsmagnetisierung (Spin-Gitter-Relaxation) und andererseits der Verlust der Kohärenz des Spinensembles (Spin-Spin-Relaxation). Erstere wird durch die charakteristische Zeitkonstante  $T_1$ , letztere durch  $T_2$  beschrieben. Beide Relaxationsphänomene werden von Wechselwirkungen der Teilchen untereinander und mit externen Feldern beeinflusst<sup>[81–83]</sup>. Fluktuationen des Magnetfeldes am Ort des Spins rühren z.B. von dem Magnetfeld der Nachbarspins, Fluktuationen des angelegten Feldes, etc. Wichtig sind in dieser Arbeit die Dipol-Dipol (DD-WW). Weitere NMR Wechselwirkungen, wie z.B. die chemische Verschiebung, werden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da diese im Vergleich zur vorher genannten eine untergeordnete Rolle spielen.

### 3.2.1. Relaxation durch Dipol-Dipol Wechselwirkung

Da bei Protonen mit Spin  $I = 1/2$  die Dipol-Dipol Wechselwirkung dominiert, sei die theoretische Beschreibung dieser hier kurz vorgestellt. Die Fluktuationen der DD-WW wird durch die zufällige Bewegung der Dipol-Paare (i,j) bestimmt. Quantenmechanisch wird die DD-WW durch den homonuklearen Hamiltonian

$$\mathcal{H}_{dd} = \frac{3}{2} \gamma_I^2 \hbar [\mathcal{A} + \mathcal{B} + \mathcal{C} + \mathcal{D} + \mathcal{E} + \mathcal{F}] \quad (3.5)$$

beschrieben. Dabei nennt man die Operatoren  $\mathcal{A}$  bis  $\mathcal{F}$  das dipolare Alphabet:

$$\mathcal{A} = (1 - 3 \cos^2(\Theta)) I_{iz} I_{jz} \quad (3.6)$$

$$\mathcal{B} = -\frac{1}{4} (1 - 3 \cos^2(\Theta)) (I_{i+} I_{j-} + I_{i-} I_{j+}) \quad (3.7)$$

$$\mathcal{C}, \mathcal{D} = -\frac{3}{2} \sin(\Theta) \cos(\Theta) \exp(\mp i\varphi) (I_{iz} I_{j\pm} + I_{i\pm} I_{jz}) \quad (3.8)$$

$$\mathcal{E}, \mathcal{F} = -\frac{3}{4} \sin^2(\Theta) \exp(\mp 2i\varphi) I_{i\pm} I_{j\pm} \quad (3.9)$$

wobei für die Leiteroperatoren  $I_{\pm}$  gilt:

$$I_{\pm} = I_x \pm iI_y \quad (3.10)$$

Für zwei Kerne mit Spin  $I = 1/2$  gilt bei Betrachtung der Änderung der magnetischen Quantenzahl  $\Delta m$  bei Übergängen zwischen Energieniveaus folgendes:

- $\mathcal{A}$  und  $\mathcal{B}$  beschreiben energieerhaltende Spin Flip-Flop Prozesse mit  $\Delta m = 0$
- $\mathcal{C}$  und  $\mathcal{D}$  sind Übergänge mit  $\Delta m = \pm 1$  ( $\omega_0$ )
- $\mathcal{E}$  und  $\mathcal{F}$  sind Übergänge mit  $\Delta m = \pm 2$  ( $2\omega_0$ )

Die Funktionen, welche die zufällige, zeitlich abhängige Bewegung zweier Kerne i und j relativ zueinander im sphärischen Koordinatensystem beschreiben sind:

$$F_{ij}^{(0)} = -\frac{3 \cos^2(\Theta) - 1}{r_{ij}^3} \quad (3.11)$$

$$F_{ij}^{(1)} = \frac{\sin(\Theta) \cos(\Theta) \exp(-i\varphi)}{r_{ij}^3} \quad (3.12)$$

$$F_{ij}^{(2)} = \frac{\sin^2(\Theta) \exp(-2i\varphi)}{r_{ij}^3} \quad (3.13)$$

$$(3.14)$$

Damit erhält man die Autokorrelationsfunktion  $G_{ij}^{(n)}(\tau)$  und durch deren Transformation nach Fourier die spektrale Dichte der Bewegung  $J_{ij}^{(n)}(\omega)$ :

$$G_{ij}^{(n)}(\tau) = \overline{F_{ij}^{(n)}(t + \tau) F_{ij}^{(n)}(t)} \quad (3.15)$$

$$J_{ij}^{(n)}(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} G_{ij}^{(n)}(\tau) \exp(-i\omega\tau) d\tau \quad (3.16)$$

Dabei soll der Überstrich das zeitliche Mittel über  $t$  darstellen.  $T_1$  ist dann bei unkorrelierter Bewegung der betrachteten Spinpaare:

$$\frac{1}{T_{1i}} = \frac{3}{2} \hbar^2 \gamma^4 I(I+1) \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \sum_{j \neq i}^N [J_{ij}^{(1)}(\omega_L) + J_{ij}^{(2)}(2\omega_L)] \quad (3.17)$$

oder für das  $T_1$  der gesamten Probe (gemittelt über alle  $T_{1i}$ ):

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{N} \sum_i^N \frac{1}{T_{1i}} \quad (3.18)$$

$$= \frac{1}{N} \sum_i^N \frac{3}{2} \hbar^2 \gamma^4 I(I+1) \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \sum_{j \neq i}^N [J_{ij}^{(1)}(\omega_L) + J_{ij}^{(2)}(2\omega_L)] \quad (3.19)$$

Für  $T_2$  erhält man ein ähnliches Resultat:

$$\frac{1}{T_{2i}} = \hbar^2 \gamma^4 I(I+1) \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \sum_{j \neq i}^N \left[ \frac{3}{8} J_{ij}^{(0)}(0) + \frac{15}{4} J_{ij}^{(1)}(\omega_L) + \frac{3}{8} J_{ij}^{(2)}(2\omega_L) \right] \quad (3.20)$$

Für eine schnelle, isotrope Bewegung, d.h. kurze Korrelationszeit  $\tau_c \ll \omega$  der Verbindungsvektoren, wird die spektrale Dichte unabhängig von  $\omega$  und man kann das Zeitmittel der Autokorrelationsfunktion  $G_{ij}^{(n)}(\tau)$  in der spektralen Dichte durch ein Ortsmittel ersetzen. Der Abstand  $r_{ij}$  wird durch den mittleren Abstand  $r$  ersetzt, während für den winkelabhängigen Anteil in  $G_{ij}^{(n)}$  folgt:

$$\langle (1 - 3 \cos^2 \Theta)^2 \rangle = \frac{1}{2} \int_0^\pi (1 - 3 \cos^2 \Theta)^2 \sin \Theta d\Theta = \frac{4}{5} \quad (3.21)$$

$$\langle \cos^2 \Theta \sin^2 \Theta \rangle = \dots = \frac{2}{15} \quad (3.22)$$

$$\langle \sin^4 \Theta \rangle = \dots = \frac{8}{15} \quad (3.23)$$

Damit ist das Verhältnis der Spektraldichten zueinander nur noch ein konstanter Faktor:

$$J^{(0)} : J^{(1)} : J^{(2)} = \overline{F^{(0)}F^{*(0)}} : \overline{F^{(1)}F^{*(1)}} : \overline{F^{(2)}F^{*(2)}} = 6 : 1 : 4 \quad (3.24)$$

und es gilt durch Einsetzen von (3.24) in (3.19) und (3.20)  $T_1 = T_2$ . Dies ist das „motional narrowing“ Regime, in dem gilt:  $T_2 \approx T_1$ .

Bei Annahme eines Spinpaars in einem Molekül, z.B. die Protonen des Wassers, die im Mittel einen konstanten Abstand  $r$  haben und einer Brown'schen Molekularbewegung unterworfen sind, ist die Korrelationsfunktion eine monoexponentiell abfallende Funktion mit der Zeitkonstante  $\tau_c$ :

$$G(\tau) = \exp(-|\tau|/\tau_c) \quad (3.25)$$

und damit die spektrale Dichte  $J^{(n)}(\omega)$ :

$$J^{(n)}(\omega) = c_n \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \quad (3.26)$$

wobei der Vorfaktor  $c_n$  der entsprechende Wert aus 3.24 ist. Damit vereinfachen sich die Formeln für die beiden Relaxationszeiten  $T_1$  und  $T_2$  zu:

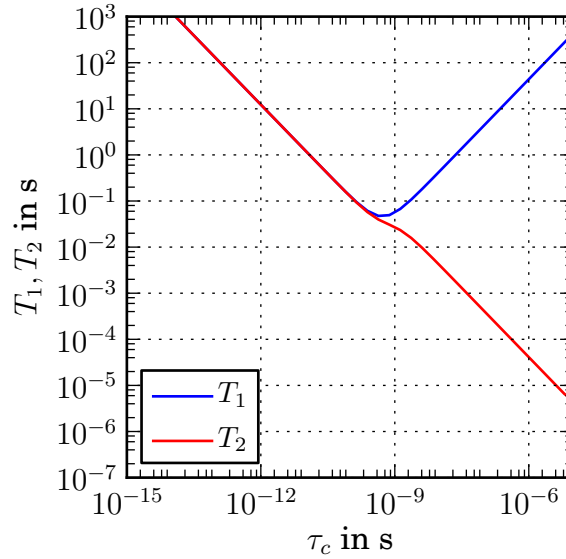
$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10r^6} \hbar^2 \gamma^4 \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \left[ \frac{\tau_c}{1 + \omega_L^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + (2\omega_L)^2 \tau_c^2} \right] \quad (3.27)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{20r^6} \hbar^2 \gamma^4 \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \left[ 3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1 + \omega_L^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + (2\omega_L)^2 \tau_c^2} \right] \quad (3.28)$$

Diese  $\tau_c$  Abhängigkeit von  $T_1$  und  $T_2$  entspricht dem BPP-Modell von Bloembergen, Purcell und Pound<sup>[84]</sup> und ist in Abb. 3.3 dargestellt. Links vom  $T_1$ -Minimum, d.h. bei höheren Temperaturen unter der Annahme dass  $\tau_c$  umgekehrt proportional der Temperatur ist, gilt  $\omega_L \tau_c \ll 1$ , während zu tiefen Temperaturen hin  $\omega_L \tau_c \gg 1$  gilt. Das  $T_1$ -Minimum befindet sich bei  $\omega_L \tau_c \approx 0.61$ .

## 3.3. Pulssequenzen

Um Informationen über die Probe mittels NMR zu erhalten, werden verschiedene Pulssequenzen angewendet, die jede für sich eine andere Fragestellung beantwortet.



**Abb. 3.3.:**  $T_1$  und  $T_2$  aufgetragen über der Korrelationszeit  $\tau_c$  nach dem Modell von Bloembergen, Purcell und Pound<sup>[84]</sup>. Verwendete Parameter:  $\omega_L = 2\pi \cdot 300 \times 10^6/\text{s}$ ,  $r = 1.48 \text{ \AA}$  und  $\gamma = 2.675 \times 10^8 /(\text{s T})$

### 3.3.1. FID

In einem perfekt homogenen  $B_0$ -Feld würde das Signal nach einem Puls, das FID, mit  $\exp -t/T_2$  gedämpft werden. Da dies in der Praxis schwer möglich ist, dephasiert das Signal durch die Inhomogenität  $\Delta B_0$  des Feldes schneller:

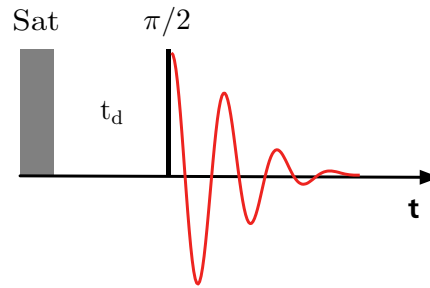
$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta B_0 \quad (3.29)$$

Eine besonders hohe Homogenität von  $B_0$  über ein großes Probenvolumen erreicht man bei Detektion im Magnetfeld der Erde in der Antarktis<sup>[85]</sup>. Im statischen Feldgradienten hingegen ist das FID praktisch nicht beobachtbar, da es innerhalb der Totzeit des Vorverstärker zerfallen ist<sup>1</sup>.

### 3.3.2. Saturation-Recovery-Experiment

Das Saturation-Recovery-Experiment (SR) wird zur Bestimmung der Spin-Gitter Relaxationszeit  $T_1$  verwendet. Mit einer Sättigungspulsfolge bestehend aus mehreren Pulsen

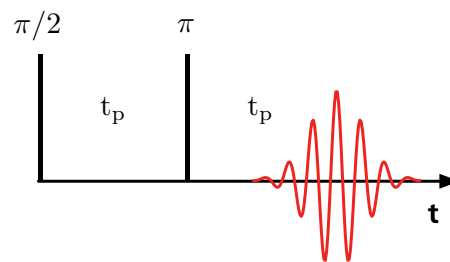
<sup>1</sup>Es sei denn, man regt nur eine sehr dünne Schicht an, siehe<sup>[86]</sup>



**Abb. 3.4.:** Saturation-Recovery-Experiment zur Bestimmung von  $T_1$ . Der  $90^\circ$ -Puls kann bei kurzen FIDs durch eine Echo-Pulssequenz ersetzt werden, um die Totzeit der Empfangselektronik zu überwinden.

wird zuerst die Magnetisierung der Probe zerstört. Nach einer Zeit  $t_d$  nach der Sättigung wird der Aufbau der Magnetisierung durch die Höhe des FID nach einem  $90^\circ$ -Puls beobachtet. Bei Proben und Aufbauten bei denen der FID zu kurz ist, um nach der Totzeit des Vorverstärkers noch ein Signal zu erhalten, wird anstelle des  $90^\circ$ -Pulses eine Echo-Pulsfolge verwendet, um das Problem der Totzeit zu umgehen. Die wichtigsten Echo-Pulsfolgen sind das Hahn-Echo sowie das „Solid Echo“ für Festkörper mit dominierender quadrupolarer Wechselwirkung. Eine Bedingung für die Anwendung der SR für die zu messende Probe ist  $T_2 \ll T_1$ , da nur dann ein vollständiger Verlust der Kohärenz durch die Sättigungspulsfolge erreichbar ist.

#### 3.3.3. Hahn-Echo-Experiment



**Abb. 3.5.:** Hahn-Echo-Experiment. Man erhält zum Zeitpunkt  $2t_p$  ein Hahn-Echo.

Das Hahn-Echo-Experiment (Abb. 3.5) dient zur Bestimmung von  $T_2$  und/oder des Diffusionskoeffizienten. Ein  $90^\circ$ -Puls klappt die Magnetisierung in die  $xy$  Ebene. Nach einer Zeit  $t_p$  wird die akquirierte Phase der Spins durch einen  $180^\circ$ -Puls invertiert. Zum Zeitpunkt  $2t_p$  nach dem ersten Puls erhält man ein Hahn-Echo<sup>[87]</sup>. Das ursprüngliche Experiment von Hahn verwendet zwei  $90^\circ$ -Pulse mit gleicher Phase. Das Solid-Echo-

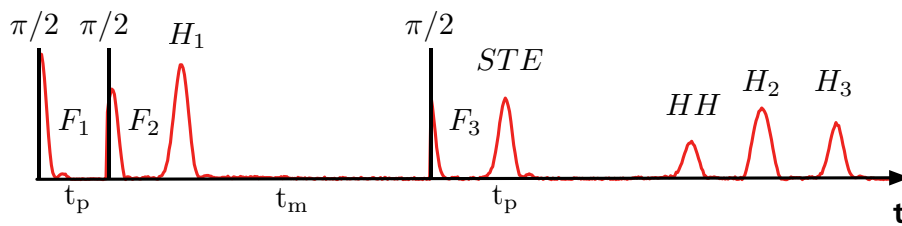
Experiment zur Refokussierung quadrupolarer Effekte unterscheidet sich davon nur durch die  $90^\circ$  Phasenverschiebung zwischen den beiden RF-Pulsen. Der Signalverlauf im Hahn-Echo-Experiment unter dem Einfluss der Spin-Spin-Relaxation kann beschrieben werden durch:

$$S(t_p) = S_0 \exp\left(-\frac{2t_p}{T_2}\right) \quad (3.30)$$

### 3.3.4. Stimuliertes-Echo-Experiment

Das Stimulierte-Echo-Experiment ist ein Drei-Puls Experiment. Man beobachtet neben den FIDs nach jedem Puls noch 5 Echos zu verschiedenen Zeiten. Durch geeignetes Zyklen der Puls- und Empfängerphase werden alle Echos außer dem Stimulierten Echo eliminiert. Dieses Experiment wird bei Spin  $I = 1/2$  Kernen hauptsächlich zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten im statischen Feldgradienten verwendet. Bei Experimenten mit  $^2\text{H}$  (Spin  $I = 1$ ) erhält man aus dem Signalverlauf die Rotationskorrelationszeit  $\tau_{c,\text{rot}}$ .

Der erste  $90^\circ$ -Puls bringt die Magnetisierung in die Transversalebene, wo die Kohärenzen mit  $T_2$  dephasieren und einen FID erzeugen ( $F_1$ ). Ein weiterer  $90^\circ$ -Puls zum Zeitpunkt  $t_p$  dreht die Magnetisierung wieder in die z-Richtung, die während  $t_p$  akquirierte Phase bleibt den Spins erhalten, da keine Spin-Spin-Relaxation wirkt. Eventuell vorhandene Restmagnetisierung in z-Richtung erzeugt einen weiteren FID ( $F_2$ ). Die restlichen Spins unterliegen dem Einfluss der Spin-Gitter-Relaxation und geben ihre Energie an das Gitter ab. Zusätzlich erhält man ein Hahn-Echo nach diesem Puls bei  $2 \cdot t_p$  ( $H_1$ ). Zum



**Abb. 3.6.:** Das Stimulierte-Echo-Experiment. Man erhält zum Zeitpunkt  $2t_p + t_m$  ein Stimuliertes-Echo (STE). Gezeigt sind die FIDs und Echos aus einem realen Experiment im homogenen Feld (Gradient  $g < 20 \text{ mT/m}$ ) an einer Wasserprobe. Die experimentellen Parameter sind  $t_p = 1 \text{ ms}$ ,  $t_m = 4.7 \text{ ms}$ ,  $T \approx 290 \text{ K}$  mit einer Pulslänge von  $t_{90} = 1.2 \mu\text{s}$ . Die Larmorfrequenz betrug  $\omega_L = 2\pi \cdot 99.5 \text{ MHz}$ .

Zeitpunkt  $t_p + t_m$  folgt ein letzter  $90^\circ$ -Puls. Wie bei den vorherigen Pulsen erhält man ein FID ( $F_3$ ). Dieser Puls erzeugt zudem noch weitere Hahn-Echos bei  $t_p + 2 \cdot t_m$  und

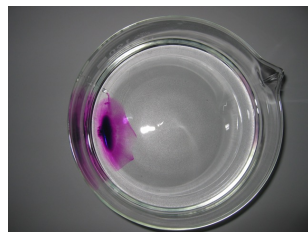
$2 \cdot (t_p + t_m)$  ( $H_2$ ,  $H_3$ ). Bei  $t_p + t_m + (t_m - t_p)$  folgt ein Echo des ersten Hahn-Echos ( $HH$ ). Das eigentliche Stimulierte-Echo erfolgt zum Zeitpunkt  $2t_p + t_m$ , also  $t_p$  nach dem dritten Puls.

Die Reduktion des Signals durch Spin-Spin- und Spin-Gitter-Relaxation lässt sich folgendermaßen beschreiben:

$$S(t_p, t_m) = S_0 \exp\left(-\frac{t_m}{T_1}\right) \exp\left(-\frac{2t_p}{T_2}\right) \quad (3.31)$$

## 3.4. Diffusion

Im Allgemeinen versteht man unter Diffusion den Prozess, durch den ein Stoff durch thermische Bewegung von einem Ort zum anderen gelangt, im klassischen Fall durch zufällige Brown'sche Bewegung. Ein typisches Experiment, um Diffusion anschaulich zu machen, ist folgendes: Man fügt einem Behälter Wasser einen kleinen Kristall Kaliumpermanganat hinzu. Das Kaliumpermanganat beginnt sich zu lösen und färbt dabei das Wasser intensiv violett. Nach einigen Stunden ist das Wasser im Behälter komplett gefärbt. Unter der Annahme das keine Konvektion vorliegt, sind Kalium- und Permanganat-Ionen *diffundiert*. Mathematisch lässt sich Bewegung eines Moleküls  $i$



(a) Wasser, kurz nachdem es mit Kaliumpermanganat versetzt wurde



(b) Nach einer Weile färbt sich das Wasser violett.

**Abb. 3.7.:** Kaliumpermanganat in Wasser.

durch eine zeitabhängige Trajektorie  $\vec{r}_i(t)$  beschreiben. Da nicht einzelne Moleküle, sondern ein ganzes Ensemble an Molekülen beschrieben werden soll, drückt man dies statistisch mit der Wahrscheinlichkeit aus, ein Teilchen zum Zeitpunkt  $t_1$  an einem Ort  $\vec{r}_1$  zu finden, wenn es ursprünglich am Ort  $\vec{r}_0(t=0)$  war. Dies ist der sogenannte *Propagator*  $P(\vec{r}_1, t | \vec{r}_0, t=0)$ . Die mathematische Formulierung der Änderung der Konzentration im Laufe der Zeit durch Diffusion wird mit dem zweiten Fick'schen Gesetz



beschrieben:

$$\frac{\partial c(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 c(\vec{r}, t) \quad (3.32)$$

wobei  $c$  die Konzentration zum Zeitpunkt  $t$  am Ort  $\vec{r}$  beschreibt.  $D$  ist der Diffusionskoeffizient der beschreibt, wie schnell dieser Prozess vonstatten geht. Man muss jedoch zwischen Diffusion und Selbst-Diffusion unterscheiden. Im vorher genannten Experiment ist, aufgrund des Konzentrationsgradienten, das System zum Zeitpunkt  $t = 0$  *nicht* im Gleichgewicht. Mit der Zeit jedoch wird das System eine homogene Konzentration der Permanganat-Ionen im Wasserglas anstreben.

Im Falle von *Selbstdiffusion* jedoch, ist das System schon zur Startzeit im Gleichgewicht! Dies kann man sich vorstellen, indem man ein System von physikalisch *identischen* Molekülen betrachtet, bei denen die Hälfte der Moleküle in irgendeiner Art und Weise markiert<sup>2</sup>, und zur Startzeit  $t = 0$  von den unmarkierten Molekülen separiert sind. Thermodynamisch gesehen bleibt das System im Gleichgewicht, die Moleküle mischen sich mit der Zeit  $t$  dennoch aufgrund von Brown'scher Bewegung.

Da bei Selbstdiffusion kein Konzentrationsgradient vorliegt, betrachten wir stattdessen die *Gesamtwahrscheinlichkeit*  $\Psi(\vec{r}, t)$  ein Teilchen zum Zeitpunkt  $t$  am Ort  $\vec{r}$  zu finden:

$$\Psi(\vec{r}, t) = \int \varrho(\vec{r}_0) P(\vec{r}_1, t | \vec{r}_0, t = 0) d\vec{r}_0 \quad (3.33)$$

Die Integration berücksichtigt alle möglichen Startpunkte  $\vec{r}_0$  und  $\varrho(\vec{r}_0)$  bezeichnet die Teilchendichte am Ort  $\vec{r}_0$ . Ähnlich der Konzentration  $c$ , beschreibt  $\Psi(\vec{r}, t)$  die Wahrscheinlichkeit ein Teilchen zum Zeitpunkt  $t$  am Ort  $\vec{r}_0$  zu finden. Während die Konzentration  $c$  die Wahrscheinlichkeit beschreibt *irgendein* Teilchen am Ort  $\vec{r}_0$  zu finden, unterscheidet sich  $\Psi(\vec{r}, t)$  dadurch, eine Art über alle Teilchen gemittelte „Wahrscheinlichkeitskonzentration“ für ein *bestimmtes* Teilchen zu sein<sup>[88]</sup>. Mit dieser Verknüpfung lässt sich Gl. 3.32 mit  $P(\vec{r}_1, t | \vec{r}_0, t = 0)$  ausdrücken:

$$\frac{\partial P(\vec{r}_1, t | \vec{r}_0, t = 0)}{\partial t} = D \nabla^2 P(\vec{r}_1, t | \vec{r}_0, t = 0) \quad (3.34)$$

Man erhält als Lösung für das zweite Fick'sche Gesetz (Gl. 3.34) den Gauß'schen

<sup>2</sup>Die Markierung soll nicht die Mobilität, GröÙe, Gewicht, etc. ändern.

Propagator in 3 Dimensionen:

$$P(\vec{r}_1, t | \vec{r}_0, t = 0) = (4\pi Dt)^{-\frac{3}{2}} \exp\left(-\frac{(\vec{r}_1 - \vec{r}_0)^2}{4Dt}\right). \quad (3.35)$$

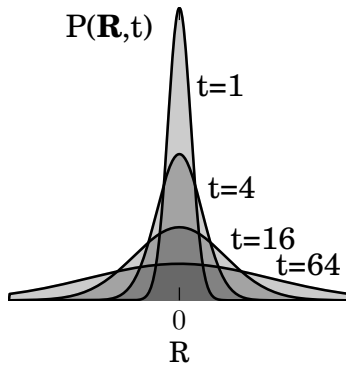
mit den Randbedingungen

$$P(\vec{r}_1, t | \vec{r}_0, t = 0) = \delta(\vec{r}_1 - \vec{r}_0) \quad (3.36)$$

$$\lim_{\vec{r}_1 \rightarrow \infty} P(\vec{r}_1, t | \vec{r}_0, t = 0) = 0 \quad (3.37)$$

Wie in Gleichung 3.35 erkennbar ist, hängt der Propagator  $P(\vec{r}_1, t | \vec{r}_0, t = 0)$  von der Verschiebung  $\vec{r} = \vec{r}_1 - \vec{r}_0$  ab. Gleichung 3.35 kann dann durch Mittelung über das gesamte Ensemble ( $\langle \dots \rangle$ ) zum mittleren Propagator vereinfacht werden:

$$\langle P(\vec{r}_0 + \vec{r}, t | \vec{r}_0, t = 0) \rangle = \overline{P(\vec{r}, t)} = (4\pi Dt)^{-\frac{3}{2}} \exp\left(-\frac{\vec{r}^2}{4Dt}\right).$$



**Abb. 3.8.:** Verlauf des Propagators (1D) mit der Zeit  $t$ . Der Propagator gibt die bedingte Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Teilchen in der Zeit  $t$  eine Verschiebung um  $\vec{r}$  erfahren hat.

Aus diesem mittleren Propagator, der einer normierten Wahrscheinlichkeitsfunktion entspricht, lässt sich das zweite Moment, bzw. der Erwartungswert für das *mittlere Verschiebungsquadrat*  $\langle \vec{r}^2 \rangle$  bestimmen<sup>3</sup>:

$$\langle \vec{r}^2 \rangle = \int_V \vec{r}^2 P(\vec{r}, t) d\vec{r} = 6Dt. \quad (3.38)$$

Gleichung 3.38 ist die Einstein-Gleichung, welche die lineare Abhängigkeit des mittleren Verschiebungsquadrats  $\langle \vec{r}^2 \rangle$  von der Zeit  $t$  und des Diffusionskoeffizienten  $D$  beschreibt. Bei Gültigkeit der Einstein-Gleichung spricht man von **freier** oder **normaler** Diffusion. Die Feldgradienten-NMR erlaubt im Prinzip die mittlere Verschiebung, gemittelt über alle Teilchen, in Abhängigkeit der Zeit  $t$  zu bestimmen, und daraus den Diffusionskoeffizienten abzuleiten. Im mikroskopischen Bild kann der

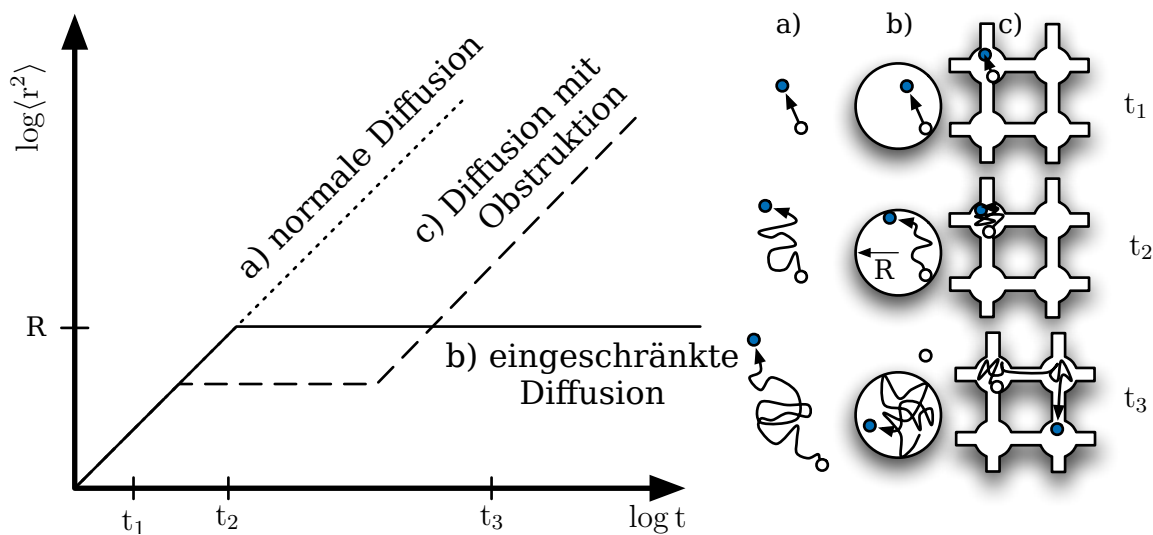
Diffusionskoeffizient  $D$  nach Gl. 3.38 durch die Einstein-Smoluchowski-Gleichung beschrieben werden:

$$D = \frac{\Gamma}{6} a^2 \quad (3.39)$$

<sup>3</sup>Da die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Teilchen um  $+\vec{r}$  oder  $-\vec{r}$  bewegt hat gleich ist, verschwindet das erste Moment:  $\langle \vec{R} \rangle = 0$ .

mit der Sprungrate  $\Gamma$  und der Sprunglänge  $a$ . Hiermit wird ein „Random-Walk“-Prozess mit konstanter Sprunglänge und -rate in drei Dimensionen beschrieben. Der Faktor 6 in Gleichungen 3.38 und 4.10 wird zu 2 bei 1D-, bzw. 4 bei 2D-Diffusion.

Bei Diffusion in eingeschränkten Geometrien (Confinements), das bedeutet die Bewegung der Teilchen ist räumlich durch die Geometrie beschränkt, verliert die bisherige Beschreibung teilweise ihre Gültigkeit. Es hängt jetzt davon ab auf welchen Längen- und Zeitskalen Messungen der mittleren quadratischen Verschiebung durchgeführt werden. In Abb. 3.9 ist das mittlere Verschiebungsquadrat über der Zeit in doppelt-logarithmischer Auftragung gezeigt. Bei normaler Diffusion wächst  $\langle \vec{r}^2 \rangle$  laut der Einstein-Gleichung linear mit der Zeit an (a). Bei eingeschränkter Diffusion, z.B. Wasser ist in einer Pore mit dem Durchmesser  $R$  eingeschlossen, folgt  $\langle \vec{r}^2 \rangle$  zunächst dem Verlauf der normalen Diffusion. Sobald die Teilchen die Einschränkung mit wachsender Zeit  $t$  spüren wird  $\langle \vec{r}^2 \rangle$  Zeitunabhängig:  $t > R^2/6D$ . Die Teilchen erfahren im Mittel immer die gleiche Verschiebung, welche nur von der Porengröße abhängt (b). Im dritten Szenario, Diffusion mit Obstruktion, folgt  $\langle \vec{r}^2 \rangle$  nur im Grenzfall langer Zeiten der Einstein-Gleichung. Der *apparente* Diffusionskoeffizient ist kleiner als der echte Diffusionskoeffizient.



**Abb. 3.9.:** Der zeitliche Verlauf des mittleren Verschiebungsquadrats  $\langle \vec{r}^2 \rangle$  schematisch gezeigt für normale Diffusion und verschiedene Arten der anormalen Diffusion (siehe Text).

### 3.4.1. Feldgradienten-NMR

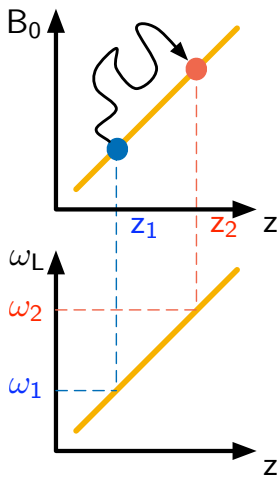
SFG-NMR wurde zuerst von Hahn<sup>[87]</sup> verwendet, um Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Die Methode wurde später im Streufeld von supraleitenden Magneten durchgeführt, um stärkere Gradienten von ca. 40 T/m zu erreichen<sup>[89]</sup>. Das Prinzip der Feldgradienten-NMR zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten basiert auf der Ortsabhängigkeit der Larmorfrequenz aufgrund des Feldgradienten:

$$\omega_L(z) = \gamma B_0 + \gamma g z \quad (3.40)$$

Alle Pulssequenzen zur Messung von Diffusion basieren auf folgenden Schritten: Nachdem die Magnetisierung im thermischen Gleichgewicht ist, erzeugt ein RF-Präparationspuls eine kohärente Magnetisierung. Mit fortschreitender Zeit wird der Verlust der Kohärenz zunehmend größer, da die Spins durch die unterschiedliche Larmorfrequenz eine unterschiedliche Phase akquirieren. Die Dephasierung  $\Phi(t)$  eines Spins wird durch das Zeitintegral

$$\Phi(t) = \int_0^t \omega_L(t) dt = \int_0^t \gamma g z(t) dt \quad (3.41)$$

beschrieben.



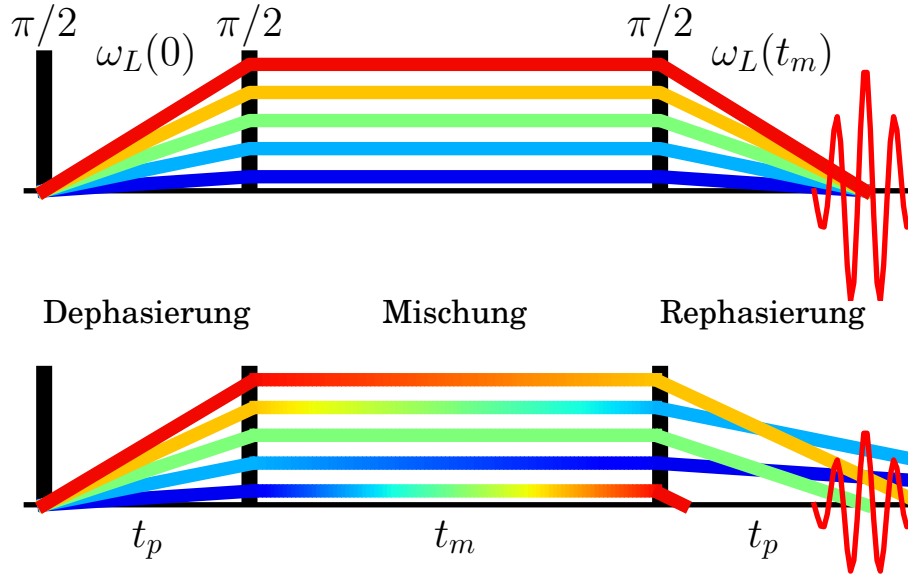
**Abb. 3.10.:** Ortsabhängigkeit der Larmorfrequenz  $\omega$ . Ändert ein Spin seinen Ort, so ändert sich seine Larmorfrequenz.

Falls alle Spins am gleichen Ort verbleiben, erhält man durch geeignete Umkehrung der Phasenänderung eine Refokussierung der Kohärenzen (unter Vernachlässigung von Relaxationseffekten). Im Falle von statischen Feldgradienten erlaubt ein  $180^\circ$ -Puls die Umkehrung der Phasenänderung  $\Phi(t)$ . Die Summe der Phasendifferenzen verschwindet dann zum Zeitpunkt des Echos  $t = 2t_p$ :

$$\Delta\Phi(t) = \int_0^{t_p} \gamma g z dt - \int_{t_p}^{2t_p} \gamma g z dt = 0. \quad (3.42)$$

Für das STE-Experiment ist in Abb. 3.11 das Prinzip der Feldgradienten-NMR dargestellt. Jede Farbe entspricht der Larmorfrequenz an einem bestimmten Ort. Im ersten Intervall von  $t = 0 \rightarrow t_p$  dephasieren die Spins unterschiedlich schnell, angedeutet durch die unterschiedliche Steigung. Ohne Diffusion ändert sich die Larmorfrequenz während der Mischzeit  $t_m$  nicht, so werden die Spins im letzten Zeitintervall mit derselben Ge-

schwindigkeit wie im ersten Intervall rephasieren und man erhält durch die Refokussierung ein Echo. Unter dem Einfluss von Diffusion hingegen kann sich der Ort und damit die Larmorfrequenz  $\omega_L$  der Spins ändern. Dadurch ergibt sich keine vollständige Refokussierung der Kohärenzen, und man beobachtet eine Erniedrigung der Echo-Höhe.



**Abb. 3.11.:** STE-Experiment bei Anwesenheit eines statischen Feldgradienten ohne Diffusion (obere Grafik) und mit Diffusion (untere Grafik). Die Farben geben die ortsabhängige Larmorfrequenz an, die Steigung markiert die Geschwindigkeit der Phasenänderung. Unter Einfluss von Diffusion können die Spins ihren Ort und damit ihre Larmorfrequenz ändern. Nach dem dritten Puls ist somit die Refokussierung der Spins nicht mehr vollständig und man erhält eine verringerte Echohöhe.

Falls die Spins nun während des Experiments eine Translation in z-Richtung erfahren, unterscheidet sich die absolute Phasenänderung während der beiden Intervalle ( $\Delta\Phi(t) \neq 0$ ) und es kommt zu Signalverlust. Dieser Signalverlust in Abhängigkeit der Zeit und Gradientenstärke lässt sich allgemein durch folgendes Doppelintegral beschreiben, eine Lösung der Bloch-Torrey-Gleichung<sup>[90]</sup> mit zeitabhängigen Gradienten<sup>[91,92]</sup>:

$$S(t) = S(0) \exp \left( -D\gamma^2 \int_0^t \left[ \int_0^{t'} g^*(t'') dt'' \right]^2 dt \right). \quad (3.43)$$

Um die Wirkung von  $180^\circ$ -RF-Pulsen zu berücksichtigen, beschreibt  $g^*(t)$  den effektiven Gradienten nach Karlicek und Lowe<sup>[91]</sup>. Man erhält den effektiven Gradienten  $g^*(t)$  in

einer Pulsfolge, in dem vom Zeitpunkt des Echos aus zeitlich rückwärts das Vorzeichen für alle Gradienten *vor* jedem 180°-Puls<sup>4</sup> sukzessive invertiert werden. Das Konzept der effektiven Gradienten wird in der Literatur leider nicht einheitlich behandelt, und es wird nicht immer klargestellt, ob *effektive* oder *reale* Gradienten beschrieben werden<sup>[92,93]</sup>. Dies muss insbesondere bei Übertragung von PFG-Pulssequenzen aus Publikationen berücksichtigt werden. Bei allen hier gezeigten Pulsfolgen mit Feldgradienten werden immer reale Gradienten gezeigt.

Im folgenden wird das Ergebnis der Feldgradienten-NMR in Verbindung mit dem Strukturfaktor  $S(q, t)$  der inkohärenten elastischen Neutronenstreuung gebracht<sup>[88,94,95]</sup>. Die Amplitude des Echos kann geschrieben werden als Mittelung über alle Phasen  $\gamma g t$  aller Spins, jeweils gewichtet mit der Wahrscheinlichkeit  $\overline{P(\vec{r}, t)}$  eine Verschiebung um  $\vec{r}$  erfahren zu haben:

$$S(g, t) = \int_V \overline{P(\vec{r}, t)} \exp(i\gamma g t \vec{r}) d\vec{r} \quad (3.44)$$

Ein Vergleich mit  $S(q, t)$  aus der Neutronenstreuung:

$$S(\vec{q}, t) = \frac{1}{N} \sum_i \exp(i\vec{q}[\vec{r}_{1,i}(t) - \vec{r}_{0,i}(0)]) = \frac{1}{N} \sum_i \exp(i\vec{q}\vec{r}_i) \quad (3.45)$$

liefert durch Vergleich der Faktoren im Exponenten den Zusammenhang:

$$q = \gamma g t \quad (3.46)$$

Dieses  $q$  hat wie in der Neutronenstreuung die Einheit einer inversen Länge und beschreibt die dynamische Streulänge. Gleichung 3.44 lässt sich dann analog zu Gl. 3.45 schreiben als:

$$S(q, t) = \int_V \overline{P(\vec{r}, t)} \exp(iq\vec{r}) d\vec{r} \quad (3.47)$$

---

<sup>4</sup>Zwei 90°-Pulse entsprechen hierbei einem 180°-Puls.

### 3.4.2. Experimente zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten

#### SFG-Hahn-Echo-Experiment

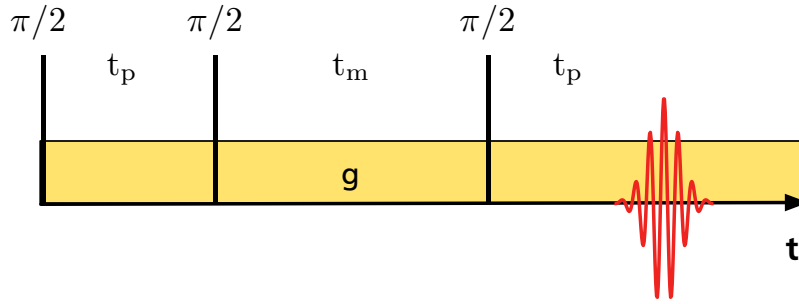
Durch Aufteilung in Intervalle lässt sich Gl. 3.43 ausrechnen und man erhält für das SFG-Hahn-Echo-Experiment den Signalverlust durch Diffusion in Abhängigkeit der Evolutionszeit  $t_p$ :

$$S_{SFG}(t_p, g) = S_0 \exp\left(-\frac{2t_p}{T_2}\right) \exp\left(-\frac{2}{3}\gamma^2 g^2 t_p^3 D\right) \quad (3.48)$$

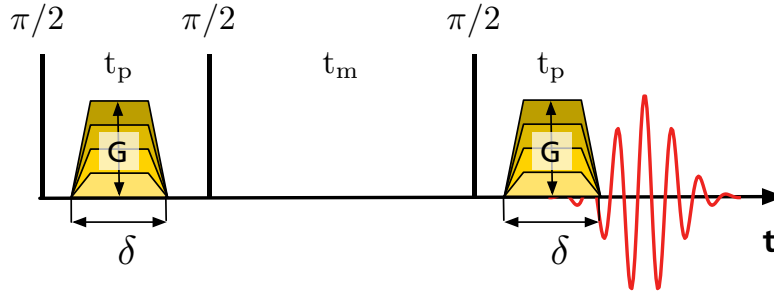
Der Vorteil des STE-Experiments (siehe Abb. 3.12) gegenüber dem bisher beschriebenen Hahn-Echo zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten liegt in der Verlängerung der Diffusionszeit um die Mischzeit  $t_m$ . Bei üblichen Proben ist  $T_2$  ( $\sim 100 \mu\text{s}$ ) sehr viel kürzer als  $T_1$  ( $\sim 1 \text{ s}$ ). Dies bedeutet, dass bei diesen Proben die Diffusionszeit teilweise um mehrere Größenordnungen verlängert, und damit die Empfindlichkeit auf Diffusion drastisch verbessert werden kann. Allerdings verliert man durch die STE-Pulsfolge die Hälfte der Signalintensität verglichen mit dem Hahn-Echo<sup>[92]</sup>. In der Regel wird  $T_1$  durch ein Saturation-Recovery-Experiment bestimmt und dann während der Datenauswertung beim Anpassung festgehalten. Der  $T_2$ -Relaxationsterm geht als konstanter Faktor in  $S_0$  ein, sofern das  $t_p$  konstant gehalten wird und nur die Mischzeit  $t_m$  variiert wird. Somit bleibt als Anpassungsparameter von  $S(t_m)$  nur noch die Amplitude  $S_0$  und der Diffusionskoeffizient  $D$ . Der Gradient wird durch eine Diffusionsmessung an einer Probe mit bekanntem Diffusionskoeffizienten bestimmt. Bei den hier vorgestellten Messungen wurde dabei mit Wasser und Tetradekan als Testsubstanzen kalibriert. Für diese beiden, sowie 5 weitere Substanzen, sind sehr sorgfältig bestimmte Diffusionskoeffizienten zur Kalibration von gepulsten Feldgradienten von Holz et al. tabellarisiert worden<sup>[96,97]</sup>.

Der Abfall des STE bei Anwesenheit eines statischen Feldgradienten der Stärke  $g$  wird beschrieben durch:

$$S_{SFG}(t_p, t_m, g) = S_0 \exp\left(-\frac{t_m}{T_1}\right) \exp\left(-\frac{2t_p}{T_2}\right) \exp\left(-\overbrace{\gamma^2 g^2 t_p^2 \left(t_m + \frac{2}{3}t_p\right)}^b D\right) \quad (3.49)$$



(a) Stimuliertes-Echo-Experiment im statischen Feldgradienten (SFG-STE-Experiment).



(b) Stimuliertes-Echo-Experiment mit gepulsten Feldgradienten (PFG-STE-Experiment).

Abb. 3.12.

Alle Faktoren ohne Diffusionskoeffizient  $D$  des  $T_1$ - und  $T_2$ -unabhängigen Teils von Gl. 3.49 können dabei zum Reduktionsfaktor  $b$  zusammengefasst werden. Bei Auftragung von  $\ln S$  über  $b$  ergibt sich bei Vernachlässigung von Relaxation eine Gerade, unabhängig der Wahl der experimentellen Parameter  $g$ ,  $t_p$  und  $t_m$ .

#### PFG-STE-Experimente

Der Abfall bei gepulsten Feldgradienten der Pulsdauer  $\delta$  und Gradientenstärke  $G$  lautet für rechteckige Gradientenpulse bei Vernachlässigung von Spin-Spin- und Spin-Gitter-Relaxation:

$$S_{\text{PFG}}(t_p, t_m, G, \delta) = S_0 \exp \left( - \overbrace{\gamma^2 G^2 \delta^2 \left( t_m + \frac{2}{3} \delta \right)}^b D \right) \quad (3.50)$$

Bei einem typischen PFG-STE-Experiment werden  $t_m$  und  $t_p$  festgehalten und nur  $G$  variiert. Dadurch enthält  $S_0$  implizit den Signalverlust durch Spin-Gitter- und Spin-Spin-Relaxation. Der Fitparameter  $S_0$  kann dann entfallen, da dieser direkt bestimmbar ist:  $S_0 = S(t_p, t_m, G = 0, \delta)$ . Bei Auftragung von  $S_{\text{PFG}}/S_0$  über  $b$  bleibt somit als Fitparameter



nur noch der Diffusionskoeffizient  $D$ . Diese Formel muss für geformte Gradientenpulse modifiziert werden. Man erhält für  $\sin^2$ -förmige Gradienten den Verlauf<sup>[98]</sup> (Spin-Spin- und Spin-Gitter-Relaxation werden vernachlässigt):

$$S_{\text{PFG}}(G, \delta) = \exp \left( -(\gamma \delta G)^2 \left[ \frac{t_p + t_m}{4} - \frac{\delta}{12} + \frac{5\delta}{16\pi^2} \right] D \right) \quad (3.51)$$

Der Vorteil der geformten Pulse ist die Verringerung Wirbelströmen, da un stetige Sprünge des Feldes vermieden werden.

### 3.4.3. Vergleich von statischer mit gepulster Feldgradienten NMR

In der AG Fujara existieren zwei speziell zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten gebaute supraleitende Magnete mit zwei Magnetspulen in Maxwell-Konfiguration, um Gradientenstärken von bis zu 180 T/m zu erreichen<sup>[99]</sup>. Mit einem dieser Aufbauten wurde an einem Molekulkristall aus Camphen der kleinste Diffusionskoeffizient veröffentlicht ( $D = 3 \times 10^{-16} \text{ m}^2/\text{s}$ ), der mittels NMR gemessen wurde<sup>[100]</sup>. Derart starke Gradienten stellen große Herausforderungen an die verwendete Spektrometer, insbesondere benötigt man eine Messkarte mit hoher Samplingrate, um die aufgrund des kurzen  $T_2^*$  wenige  $\mu\text{s}$  breiten Echos aufzunehmen. Des weiteren werden starke RF-Pulse (1 kW) benötigt, um eine möglichst breite Probenschicht anzuregen. Typische Anregungsbreiten sind ca. 100  $\mu\text{m}$  und häufig begrenzt durch die Güte des Schwingkreises<sup>[101]</sup>. Dies bedingt im wesentlichen das niedrige Signal-Rausch-Verhältnis der SFG verglichen mit PFG.

#### NMR mit gepulsten Magnetfeldgradienten

Seit der Veröffentlichung von Stejskal und Tanner<sup>[102]</sup> zur Benutzung schaltbarer Magnetfeldgradienten im Jahr 1965 wurden Technik und Protokolle zur NMR Diffusionsmessung mit Hilfe von gepulsten Magnetfeldgradienten (PFG, von *engl.* Pulsed Field Gradients) stetig weiterentwickelt.

Kommerziell erhältliche Gradientensystem erreichen heutzutage 30 T/m<sup>5</sup>, darüber hin-

<sup>5</sup>Bruker MICRO 5 IMAGING PROBE

aus haben einige Arbeitsgruppen Systeme mit noch höheren Gradientenfeldern entwickelt. Galvosas<sup>[92,103,104]</sup> beschreibt ein System mit dem Messungen mit bis zu 35 T/m durchgeführt worden sind. Callaghan beschreibt ein System mit 40 T/m<sup>[105]</sup>, Zhang und Cory veröffentlichen sogar ein System mit bis zu 600 T/m<sup>[106]</sup> mit dem Untersuchungen zur Spin-Diffusion in Festkörpern durchgeführt wurden<sup>[107]</sup>. Es ist jedoch anzumerken dass Experimente mit solch hohen Gradienten mit Vorsicht zu interpretieren sind und keine „Routinemessungen“ sind. Die elektrischen sowie mechanischen Anforderungen an das Spektrometer sind sehr hoch. Es werden sehr stabile Netzteile gebraucht und es muss die Wärmeenergie, die die Gradientenspulen erzeugen, abgeführt werden. Es ist nicht trivial die hohe Wärmeenergie abzuführen, welche bei Strömen bis zu 300 A und Spannungen über 100 V über der Pulsdauer von typ. 200  $\mu$ s entsteht. Ferner ist die mechanische Stabilität der RF-Spule, d.h. die Vermeidung von Schwingungen der Spule bei Anschalten eines Gradienten, sicherzustellen. Zusätzlich können durch das Schalten der starken Feldgradienten Wirbelströme erzeugt werden die mehrere Sekunden andauern. Schon kleinste Instabilitäten der Stromquelle können das Ergebnis stark verfälschen, da die Gradienten im Dephasierungs- und Rephasierungsintervall nicht mehr identisch sind und somit zusätzlichen Signalverlust verursachen. Hierüber gibt es eine Vielzahl an Literatur, es sei aber besonders auf die Promotionsarbeit von Petrik Galvosas hingewiesen<sup>[92]</sup>, die die Vielzahl der technischen Probleme und Anforderungen und deren Lösung detailliert beschreibt, sowie die Veröffentlichung von Stallmach et al., welche eine aktuelle Übersicht über die heutzutage verwendeten Pulssequenzen mit starken gepulsten Feldgradienten darstellt<sup>[108]</sup>, um einige dieser Probleme zu umgehen.

Über die Vor- und Nachteile von SFG- und PFG Experimente sind in der Vergangenheit nur wenige Veröffentlichungen publiziert worden, welche beide Methoden kritisch miteinander vergleichen<sup>[99,109,110]</sup>.

Die beiden Hauptvorteile der PFG-NMR sind zum Einen das hohe Signal-Rausch-Verhältnis (SNR; signal-to-noise ratio) und zum Anderen die Möglichkeit der spektralen Auflösung, was sich als besonders hilfreich bei Diffusionsmessungen in flüssigen Mehrkomponentensystemen erweist<sup>[111]</sup>. Das SNR im SFG kann im Prinzip, wenn es denn die Messzeit erlaubt, durch häufiges Akkumulieren des Signals ausgeglichen werden. Bei einem, anhand der Anregungsbreite eines starken RF-Pulsen geschätzten Verhältnis des SNR von PFG zu SFG von ca. 50:1, benötigt man allerdings die 2500-fache Anzahl<sup>6</sup> an Akkumulationen, um beim SFG-Experiment das gleiche SNR zu erhalten.

---

<sup>6</sup>Das SNR skaliert mit  $\sqrt{n}$  der Anzahl  $n$  der Akkumulationen unter der Annahme von „weißem Rauschen“.

Die spektrale Zuordnung von Diffusionskoeffizienten ist ein Merkmal, welches nur der PFG-NMR vorbehalten ist. Bei Messungen mit starken Gradientenpulsen jedoch wird oft während der Detektion ein kleiner Hintergrundgradient geschaltet, um den Zeitpunkt des Echos zu stabilisieren (MASSEY Experiment<sup>[112]</sup>). Damit geht aber auch die spektrale Auflösung verloren. Im SFG hingegen ist nur eine Trennung von Diffusionskoeffizienten unterschiedlicher Komponenten möglich, wenn sich die Diffusionskoeffizienten oder Relaxationsraten deutlich von einander unterscheiden, oder es die Möglichkeit gibt Kernselektiv zu messen, z.B.  $^1\text{H}$ - und  $^2\text{H}$ -,  $^7\text{Li}$ - oder  $^{17}\text{O}$ -NMR.

Bei Abwesenheit von Kreuzrelaxation (siehe Abschnitt 3.5) erlaubt das PFG Experiment durch Division von  $S(t, g)$  mit  $S(t, g = 0)$  die Eliminierung des Einflusses von Spin-Spin- und Spin-Gitter-Relaxation, siehe Gl. 3.30 und 3.50. Zur Anpassung der Daten bleibt dann nur noch der Diffusionskoeffizient  $D$  zu bestimmen. Dies erlaubt, besonders bei Flüssigkeiten, eine sehr komfortable Auswertung. Eine ähnliche Methode, die allerdings zwei getrennte Experimente benötigt, erlaubt eine ähnliche Auswertung für SFG Messungen<sup>[113]</sup>.

Das Experiment im SFG spielt seine größte Stärke bei kleinen Diffusionskoeffizienten und/oder kurzen Spin-Spin-Relaxationszeiten aus. Da keine Gradienten geschaltet werden müssen, kann bei einem STE Experiment das Evolutionszeitintervall  $t_p$  sehr kurz gemacht werden (wenige  $\mu\text{s}$ ), was im Gegensatz zum PFG steht ( $> 100\mu\text{s}$ ). Spezielle Pulssequenzen, um die Spin-Spin-Relaxation zu unterdrücken, sind sowohl für SFG<sup>[100,101,114]</sup> als auch für PFG<sup>[107]</sup> angewendet worden. Zusammen mit der hohen Gradientenstärke wird der SNR Vorteil des PFGs wieder relativiert, wenn man den gleichen Verlust der Signalamplitude zur Bestimmung von  $D$  erhalten will.

### 3.5. Diffusion unter Einfluss von Kreuzrelaxation

Edzes und Samulski beschreiben in ihren Veröffentlichungen<sup>[75,115]</sup>  $T_1$  Messungen von Wasser in Wasser-Protein-Mischungen. Sie finden dabei, dass durch Kreuzrelaxation zwischen den Wasserprotonen und den Proteinprotonen Magnetisierung ausgetauscht wird.

Als Modell verwenden sie die Bloch-Gleichung für 2 Phasen, erweitert um Austausch von Magnetisierung zwischen beiden Phasen. Dies ergibt zwei gekoppelte Differentialgleichungen für die *normierte* Magnetisierungen  $M_w$  und  $M_p$ :

$$\frac{dM_w(t)}{dt} = -R_{1w}M_w(t) - k_wM_w(t) + k_pM_p(t) \quad (3.52)$$

$$\frac{dM_p(t)}{dt} = -R_{1p}M_p(t) - k_pM_p(t) + k_wM_w(t) \quad (3.53)$$

Dabei sind  $R_{1w}$  und  $R_{1p}$  die intrinsischen Spin-Gitter Relaxationsraten von Wasser- und Proteinprotonen ohne Kreuzrelaxation und  $k_w$  sowie  $k_p$  bezeichnen die Raten für den Magnetisierungstransfer von Wasser- zu Proteinprotonen bzw. in die Gegenrichtung. Die vollständige Lösung dieser zwei gekoppelten Differentialgleichung ergibt folgende Gleichungen<sup>[116]</sup> für den zeitlichen Verlauf der normierten Wassermagnetisierung:

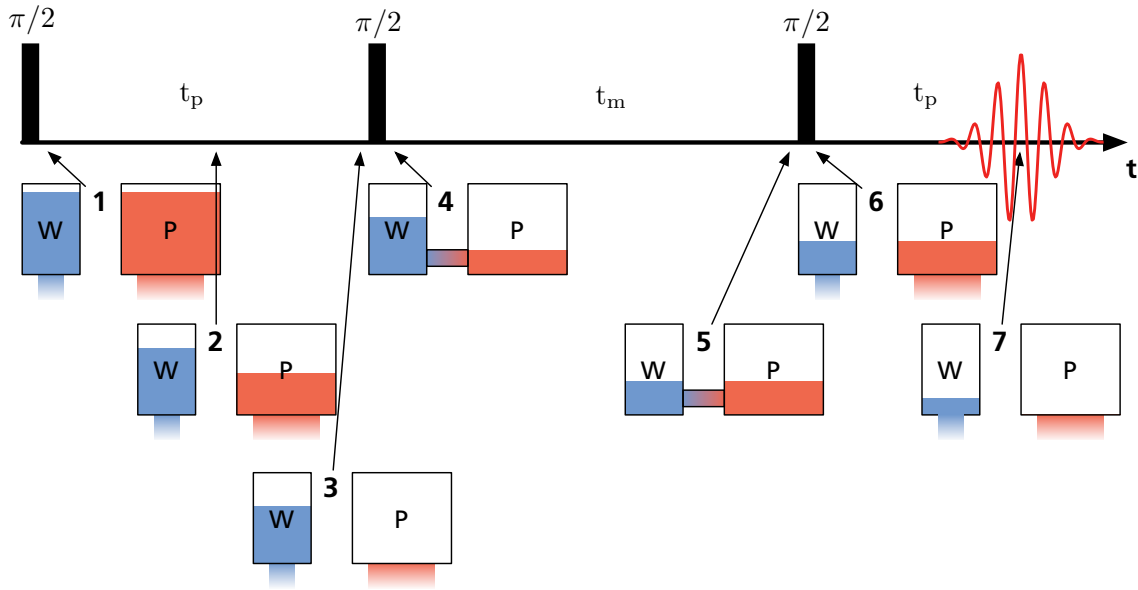
$$M_w(t) = c_{1w} \exp(-R_1 t) + c_{2w} \exp(-R_2 t) \quad (3.54)$$

$$2R_{1,2} = R_{1w} + R_{1p} + k_w + k_p \pm \left[ (R_{1w} - R_{1p} + k_w - k_p)^2 + 4k_w k_p \right]^{1/2} \quad (3.55)$$

Man erhält nach Gleichung 3.54 einen bi-exponentiellen Abfall der Magnetisierung mit den apparenten Relaxationsraten  $R_1$  und  $R_2$  jeweils gewichtet mit  $c_{1w}$  und  $c_{2w}$ . Die apparenten Relaxationsraten  $R_1$  und  $R_2$  werden dabei laut Gleichung 3.55 durch die intrinsischen Größen aus Gleichung 3.52 beschrieben. Für die Wichtungsfaktoren  $c_{1w}$  und  $c_{2w}$  erhält man:

$$\begin{aligned} c_{1w} &= M_w \frac{R_{1w} - R_2}{R_1 - R_2} + (M_w - M_p) \frac{k_w}{R_1 - R_2} \\ c_{2w} &= -M_w \frac{R_{1w} - R_1}{R_1 - R_2} - (M_w - M_p) \frac{k_w}{R_1 - R_2} \end{aligned} \quad (3.56)$$

Im STE-Experiment (siehe 3.3.4) stellt sich die Situation bei Vernachlässigung der Spin-



**Abb. 3.13.:** Schematischer Verlauf der Magnetisierung zweier Protonenspezies, Wasser und Protein, wie es sich im Stimulierten Echo Experiment unter dem Einfluss von Kreuzrelaxation darstellt. Zur näheren Erläuterung der Schritte 1 – 7 siehe Text.

Gitter Relaxationszeit  $T_1$  demzufolge so dar (vgl. Abb. 3.13): Der erste Puls kippt die Magnetisierung beider Spinspezies zur xy-Ebene (**Schritt 1**). Die Magnetisierung der Protonen des Proteins zerfällt während des Zeitintervalls  $0 - t_p$  (**Schritt 2**) schneller als die Protonenmagnetisierung des Wassers, falls die Bedingung  $T_{2,\text{Protein}} \ll T_{2,\text{Wasser}}$  erfüllt ist. Damit ist zum Zeitpunkt  $t_p$  des zweiten Pulses die Magnetisierung der Proteinprotonen zerfallen (**Schritt 3**), während die Magnetisierung des Wassers noch fast vollständig erhalten ist:  $M_w(t_p) = 1$ . Dies gilt falls die Bedingung  $T_{2,\text{Wasser}} \gg t_p \gg T_{2,\text{Protein}}$  erfüllt ist. Der zweite Puls dreht die Magnetisierung der Wasserprotonen in z-Richtung. Während der Mischzeit  $t_m$  wird durch die Kreuzrelaxation Magnetisierung auf die Proteinprotonen übertragen (**Schritt 4**) bis bei hinreichend langer Mischzeit  $t_m$  ein Gleichgewicht erreicht ist (**Schritt 5**). Nach dem dritten Puls zerfällt die Magnetisierung der Proteinprotonen aufgrund der unterschiedlichen  $T_2$  wieder deutlich schneller als die der Wasserprotonen (**Schritt 6**). Zum Stimulierten Echo trägt letztendes nur noch die Magnetisierung des Wassers bei (**Schritt 7**). Dabei gilt das Prinzip des detaillierten Gleichgewichts (engl. „detailed balance“):

$$k_w p_w = k_p p_p \quad (3.57)$$

Hier sind  $k_w$  und  $k_p$  die Transferraten zu Protein- bzw Wasserprotonen, und  $p_w$  und  $p_p$  der Anteil der Wasser- bzw. Proteinprotonen zur gesamten Anzahl der Protonen

(Tabelle 3.1).

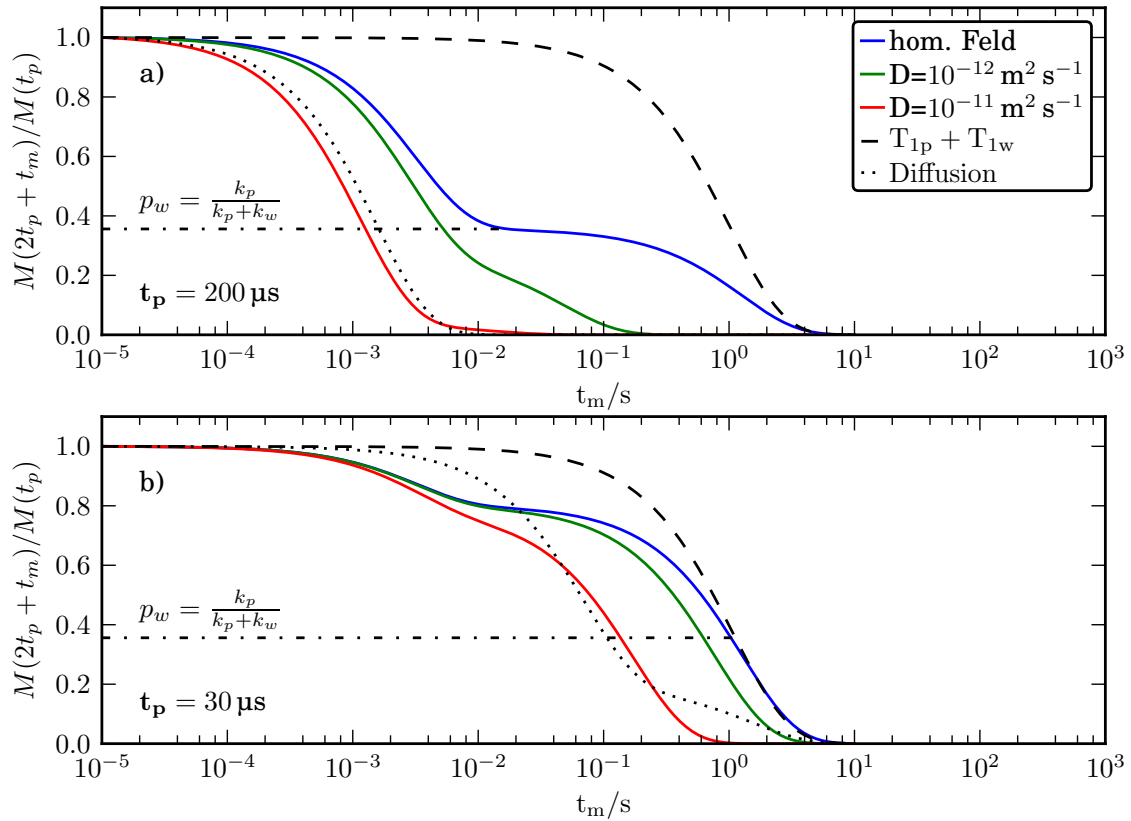
Das Modell von Edzes und Samulski vernachlässigt den chemischen Austausch von Protonen an Protein und Wasser. Hills veröffentlichte 1992 ein Modell, welches diesen Austausch mit berücksichtigt<sup>[117,118]</sup>. Bei den hier vorgestellten Messungen bei tiefen Temperaturen ist eine Beschleunigung der Kreuzrelaxation zu beobachten. Dies kann durch stärkere DD-Kopplung aufgrund von verminderter Mittelung der DD-Wechselwirkung durch langsamere Dynamik erklärt werden. Dies wiederum lässt darauf schließen, dass Flip-Flop-Prozesse im Gegensatz zu chemischem Austausch von Protonen den Magnetisierungstransfer dominieren, weshalb das Modell von Hills in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt wurde.

Ähnliche Überlegungen wie Edzes und Samulski, jedoch zusätzlich Diffusion, wurden von Peschier für eine diffusive Spezies<sup>[78]</sup> und dann später von Horstmann für zwei diffusive Spinspezies für PFG-STE Messungen an Wasser gebunden an Elastomeren, sowie Wasser in Block-Copolymeren durchgeführt<sup>[79,80]</sup>. Da das Protein selber nicht oder nur vernachlässigbar diffundiert, reichen hier die Annahmen von Peschier aus. Im Modell von Edzes und Samulski (Gl. 3.52) wird die Wassermagnetisierung mit einem Diffusionsterm erweitert:

$$\frac{dM_w(t)}{dt} = -R_{1w}M_w(t) - k_wM_w(t) + k_pM_p(t) - D(\gamma g t_p)^2 M_w(t) \quad (3.58)$$

$$\frac{dM_p(t)}{dt} = -R_{1p}M_p(t) - k_pM_p(t) + k_wM_w(t) \quad (3.59)$$

Dieses Modell wurde wie folgt numerisch gelöst, um den Einfluss der unterschiedlichen Relaxations- und Austauschraten, sowie die Wahl von  $t_p$  auf den Signalverlauf  $S(t_m)$  darzustellen. Zunächst wurde ausgehend von der Anzahl der Protonen im Wasser und Protein die Magnetisierung im thermischen Gleichgewicht definiert. Die Magnetisierungen  $M_w(t_p)$  und  $M_p(t_p)$  zum Zeitpunkt des zweiten Pulses wurden anhand typischer  $T_2$  bestimmt. Bei Raumtemperatur beträgt  $T_2$  für Wasser an Protein ca. 1 ms, das  $T_2$  des Proteins wurde zu 30  $\mu$ s festgelegt. Die Austauschrate von Wasser- zu Proteinprotonen  $k_w$  beträgt ca. 200 Hz, wodurch aufgrund des detaillierten Gleichgewichts für die Proteinaustauschrate  $k_p = 110$  Hz folgt. Mit diesen Anfangsbedingungen wird das Gleichungssystem 3.58 numerisch gelöst (siehe Anhang A.2). Der Endzustand nach jedem Zeitschritt wird, ähnlich wie im ersten Schritt, mit dem jeweiligen  $T_2$  korrigiert. Der Verlauf der auf die Signalthöhe nach dem ersten Puls normierten Echoamplitude  $M(2t_p + t_m)/M(t_p)$  ist in Abb. 3.14 für zwei Fälle dargestellt:



**Abb. 3.14.:** Numerische Lösung des Modells der Kreuzrelaxation mit Diffusion einer der beiden Spinspezies für das STE-Signal im SFG. Im Fall a), Bedingung  $T_{2,p} \ll t_p \ll T_{2,w}$  ist erfüllt, entspricht die Höhe der Stufe im homogenen Feld  $\frac{k_p}{k_w + k_p} = p_w = 0.36$  dem Anteil der Wasserprotonen. Im Fall b), bei Missachtung dieser Bedingung erscheint die Diffusion langsamer, da der Anteil der diffundierenden Spinspezies am Gesamtsignal kleiner ist (siehe Text). Gestrichelt ist der Verlauf der Magnetisierung unter ausschließlichen Einfluss von Spin-Gitter-Relaxation. Die gepunktete Linie zeigt den Signalverlauf für normale Diffusion mit  $D = 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ . Verwendete Parameter:  $N_p = 1217$ ,  $N_w = 673$ ,  $k_w = 200 \text{ Hz}$ ,  $k_p = 100.6 \text{ Hz}$ ,  $T_{1,w} = 1 \text{ s}$ ,  $T_{1,p} = 1.5 \text{ s}$ ,  $T_{2,w} = 1 \text{ ms}$ ,  $T_{2,p} = 30 \mu\text{s}$  und  $g = 150 \text{ T/m}$ . Die Signalintensität ist mit dem jeweiligen  $T_2$  gewichtet.

- a) Bedingung  $T_{2,p} \ll t_p \ll T_{2,w}$ :** Zum Zeitpunkt des zweiten Pulses und zum Zeitpunkt des Echos ist die Proteinmagnetisierung vollständig zerfallen. Die Höhe der Stufe entspricht dem Verhältnis von Wasser- zu Proteinprotonen.
- b) Bedingung  $T_{2,p} \approx t_p \ll T_{2,w}$ :** Aufgrund der zusätzlichen Magnetisierung der Proteinprotonen erhöht sich die Stufe. Der Signalanteil der diffundierenden Wasserspins erniedrigt sich, womit der Einfluss der Diffusion auf die gesamte Signalintensität verringert wird. In Abbildung 3.14 ist zum Vergleich der Signalverlauf gezeigt, wie er für reine Spin-Gitter-Relaxation erwartet wird, sowie für normale Diffusion von Wasser mit  $D = 1 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  in einer immobilen Matrix.

Das Modell von Peschier erlaubt es nun aus STE Messungen im statischen Feldgradienten durch Vergleich mit Messungen im homogenen Feld Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Ein Dividieren der STE Signale, die mit bzw. ohne Gradient resultieren, wie es insbesondere bei PFG NMR standardmäßig gemacht wird, um den Effekt von  $T_1$  und  $T_2$  zu eliminieren, führt dabei zum falschen Ergebnis. Der Abfall durch Diffusion im SFG mit Kreuzrelaxation wird unter der Bedingung  $T_{2p} \ll t_p \ll T_{2w}$  beschrieben durch:

$$m_w(t_m) = \exp\left(-\frac{2}{3}q^2 D t_p\right) \left\{ \frac{a^+ - k_p - R_{1p}}{a^+ - a^-} \exp(-a^+ t_m) - \frac{a^- - k_p - R_{1p}}{a^+ - a^-} \exp(-a^- t_m) \right\} \quad (3.60)$$

mit

$$a^\pm = \frac{1}{2} \left[ Dq^2 + k_w + R_{1w} + k_p + R_{1p} \pm \sqrt{(Dq^2 + k_w + R_{1w} - k_p - R_{1p})^2 + 4k_p k_w} \right] \quad (3.61)$$

Die Datenanalyse wurde folgendermaßen durchgeführt, um Diffusionskoeffizienten von Wasser in Proteinmatrizen zu erhalten:

1. Fitte das Modell von Peschier (Gl. 3.60) an Daten der Messungen im homogenen Feld unter der Annahme  $R_{1w} = 1/T_1$  sowie  $g = 0 \text{ T/m}$ . Damit erhalten wir  $k_w$  und  $k_p$  sowie  $R_{1p}$ . Der Effekt der Diffusion auf das STE-Signal kann im homogenen Feld vernachlässigt werden, da der konstante Feldgradient zu klein ist, um einen Einfluss auf das STE-Signal auszuüben. ( $D < 1 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ,  $g \approx 20 \text{ mT/m}$ ).
2. Im nächsten Schritt wird  $D$  an die SFG Daten angepasst. Dabei werden die Parameter  $k_w$ ,  $k_p$ ,  $R_{1p}$  sowie  $R_{1w}$  aus Schritt 1 festgehalten. Als zusätzlicher Anpassungsparameter bleibt nur noch die Anfangsamplitude.

Alternativ zur Annahme  $R_{1w} = 1/T_1$  im ersten Schritt kann man auch das Verhältnis von  $k_w/k_p$  aufgrund des Prinzips des detaillierten Gleichgewichts zu  $p_p/p_w$  (Tab. 3.1) festsetzen, vorausgesetzt  $p_p$  und  $p_w$  sind hinreichend genau bekannt. Da beide Auswertungen für die Diffusionskoeffizienten im Rahmen der Fehler kaum unterschiedliche Ergebnisse liefern, wurde diese Variante zur Auswertung nicht weiter verfolgt.

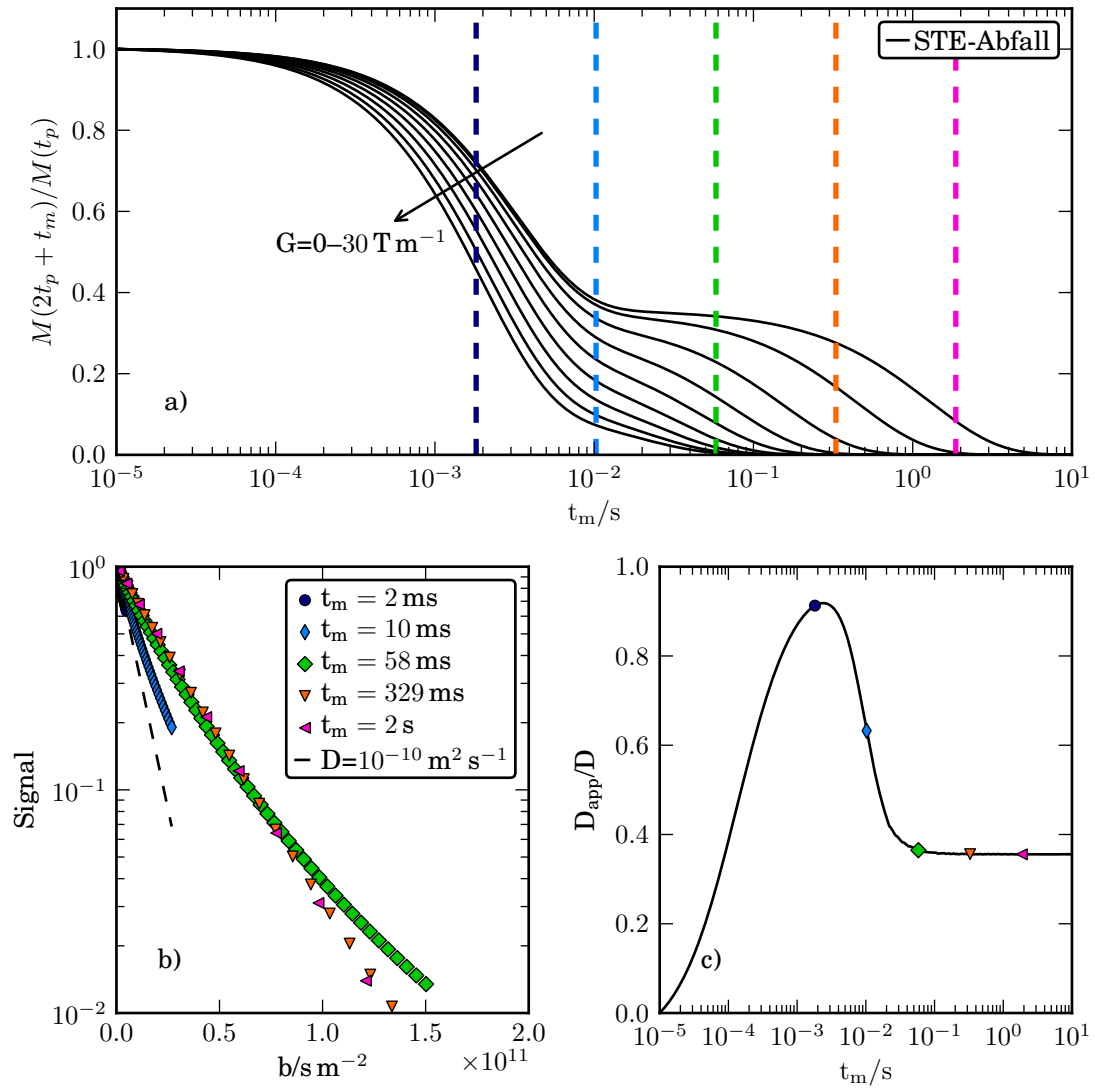


### Kreuzrelaxation und PFG-STE-Experiment

In Abbildung 3.15 wird der Einfluss von Kreuzrelaxation auf die Analyse von PFG-STE-Experimenten dargestellt. Hierzu wird das System aus Abb. 3.14 für verschiedene Gradientenstärken ( $G = 0-30 \text{ T/m}$ ) bei fester Gradientendauer  $\delta = t_p = 200 \mu\text{s}$  simuliert, und für verschiedene  $t_m$  ausgewertet (gestrichelte Linien in Abb. 3.15a). Die von der Gradientenstärke  $G$  abhängigen STE-Signale sind in Abb. 3.15b normiert auf  $S_0 = S(G = 0)$  für  $S/S_0 > 0.01$  über den Reduktionsfaktor  $b$  nach Gl. 3.50 aufgetragen. Typischerweise wird für ein STE-Experiment  $t_m > t_p$  gefordert, weshalb sich die folgende Diskussion auf das Verhalten des STE bei  $t_m > 2 \text{ ms}$  konzentriert.

Für  $t_m = 58 \text{ ms}$ , auf der Mitte des Plateaus, erhält man einen STE-Abfall, welcher typisch für *anormale* Diffusion ist. Für kürzere und längere  $t_m$  dagegen lässt sich der Abfall gut mit normaler Diffusion beschreiben. Die Ergebnisse von  $D_{\text{app}}$  durch Anpassung von Gl. 3.50 an die normierten STE-Signale für Signale  $S/S_0 > 0.1$  ist in Abb. 3.15c als Verhältnis zum tatsächlichen Diffusionskoeffizienten  $D$  in Abhängigkeit von  $t_m$  aufgetragen. Während für  $t_m > 58 \text{ ms}$  die Werte für  $D_{\text{app}}$  konvergieren, so wächst  $D_{\text{app}}$  mit kürzer werdendem  $t_m$  zunächst an, um dann für  $t_m < 2 \text{ ms}$  wieder kleiner zu werden (Abb. 3.15c).

Überraschenderweise liefert die Auswertung also aufgrund von Kreuzrelaxation bei PFG-STE-Experimenten mit langen Mischzeiten  $t_m$  einen apparenten Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{app}}$  *kleiner* als der tatsächliche Diffusionskoeffizient  $D$ . Dies steht im Gegensatz zur Beobachtung, dass durch technische Unzulänglichkeiten der apparente Diffusionskoeffizient  $D_{\text{app}}$  größer erscheint als  $D$  <sup>[105]</sup>.



**Abb. 3.15.:** (a) Numerische Simulation eines PFG-STE-Experiments für das gleiche System wie in Abb. 3.14 mit  $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ , Gradientenstärke  $G = 0 - 30 \text{ T/m}$  und -pulsdauer  $\delta = t_p = 200 \mu\text{s}$ . Die gestrichelten Linien geben das für die Auswertung verwendete  $t_m$  an. (b) Auswertung des STE für verschiedene Diffusionszeiten  $t_m$ . Man erkennt zum Einen die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten  $D$  von  $t_m$ , und zum Anderen für  $t_m = 58 \text{ ms}$  den Anschein von anormaler Diffusion. Die gestrichelte Linie deutet den tatsächlichen Diffusionskoeffizienten  $D$  an. (c) Verhältnis des apparenten Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{app}}$  zum tatsächlichen Koeffizienten  $D$  in Abhängigkeit der Diffusionszeit  $t_m$ .  $D_{\text{app}}$  wurde durch Anpassung von Gl. 3.50 an die Kurven für  $S/S_0 > 0.1$  in (b) bestimmt.

## 3.6. Residuelle Dipolkopplung

Der Effekt der residuellen Dipolkopplung<sup>[119–121]</sup> sei der Vollständigkeit halber noch erwähnt, da anfangs versucht wurde die Messungen mit diesem Modell zu beschreiben. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass die Kreuzrelaxation den Signalverlauf bestimmt. Normalerweise ist in einer Flüssigkeit die Dipol-Dipol-Kopplung aufgrund der schnellen isotropen Bewegung ausgemittelt. Falls nun aber durch geeignete Beschränkung der möglichen Orientierungen für den Dipol-Dipol-Vektor zwischen zweien Wasserprotonen keine komplette Mittelung möglich ist, verbleibt ein Rest der Dipol-Dipol-Kopplung. Da dieser Rest in der Regel klein ist spricht man von residueller Dipolkopplung.

## 3.7. Apparate und Proben

### 3.7.1. Proben

#### Myoglobin

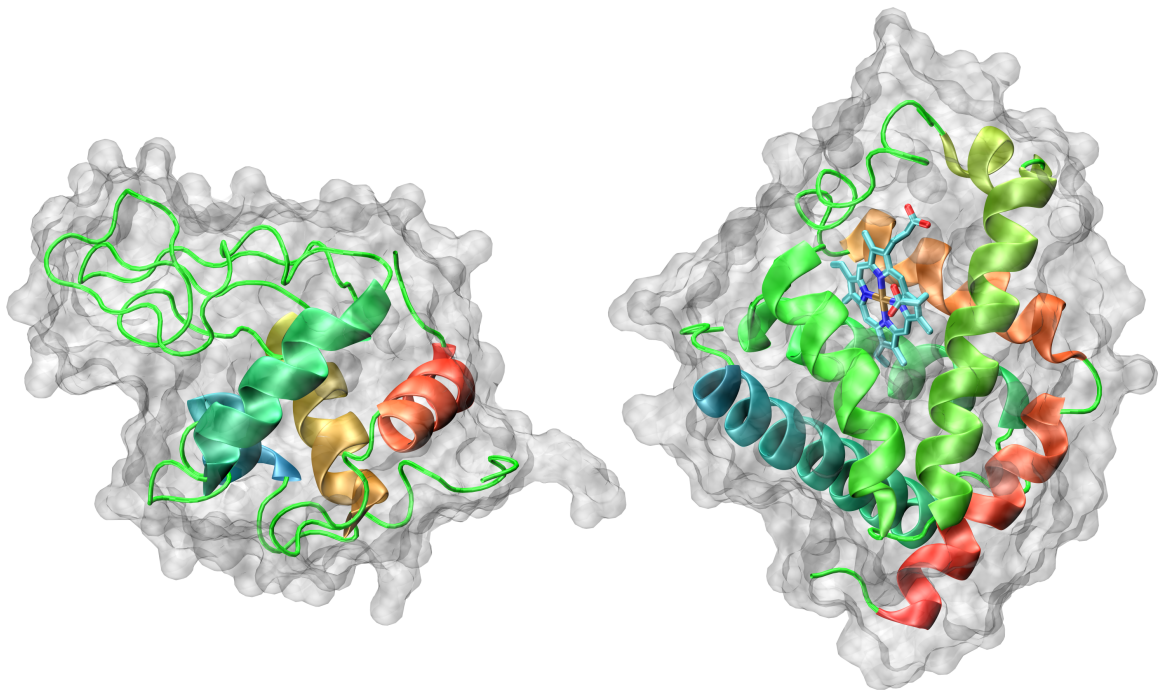
Myoglobin ist ein Protein, welches zur Sauerstoffversorgung der Muskeln dient. Es besitzt eine eisenhaltige Häm-Gruppe, welche der Speicherung des Sauerstoffs während des Transports dient. Es ist ein ellipsoid geformtes Protein mit einer Größe von etwa  $4\text{ nm} \times 4\text{ nm} \times 2\text{ nm}$ . Myoglobin war das erste Protein, dessen Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt wurde.

**Listing 3.1:** Aminosäuresequenz von Myoglobin (Pottwal, UniProt P02185, 154 AA, 17.331 kDa):

```
MVLSEGEWQLVLHVWAKVEADVAGHGQDILIRLFKSHPETLEKFDRFKHLKTEAEMKASE
DLKKHGVTVLTALGAILKKKGHHEAELKPLAQSHATKHKIPIKYLEFISEAIIHVLHSRH
PGDFGADAQGAMNKALELFRKDIAAKYKELGYQG
```

#### Lysozym

Lysozym kommt im Immunsystem von Menschen und Tieren vor und dient der Abwehr von Bakterien. Es ist das erste Protein dessen Aminosäuresequenz komplett bestimmt



**Abb. 3.16.:** Struktur von Lysozym (links) und Myoglobin (rechts). Gezeigt sind die  $\alpha$ -Helices der Sekundär-Struktur sowie für Myoglobin die Häm-Gruppe (Stäbchen). Hell schattiert ist die „Solvent Accesible Surface“. Sie repräsentiert die Oberfläche des Proteins zugänglich für eine Kugel mit Radius 1.4 Å (Radius eines Wassermoleküls) <sup>[122,123]</sup>.

wurde, und das zweite Protein nach dem Myoglobin, dessen Struktur mit Hilfe von Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurde. Es ist ebenfalls ellipsoid in der Form und etwas kleiner als Myoglobin. Seine Ausmaße sind etwa 3 nm  $\times$  3 nm  $\times$  4.5 nm

**Listing 3.2:** Aminosäuresequenz von Lysozym (Hühnereiweiss, UniProt P00698, 147 Aminosäuren, 16.239 kDa):

```
MRSLILVLCFLPLAALGKVFGRCELAAAMKRHGLDNRYGSLGNWVCAAKFESNFNTQA  
TNRNTDGSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNCAKKIVSDG  
NGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGRL
```

## Probenherstellung

Myoglobin vom Pottwal und Lysozym aus dem Hühnereiweiss, von Sigma-Aldrich erworben, wurden zunächst in einem Exsikkator mit Hilfe von Phosphorpentoxid  $P_2O_5$  getrocknet. Die Proben wurden gewogen und anschließend solange Wasser aus einer Millipor-Wasseraufbereitungsanlage zugefügt, bis der gewünschte Hydratationsgrad erreicht wurde. Der Hydratationsgrad für die Myoglobinprobe beträgt  $h=0.35$  Gramm Wasser pro Gramm Protein, für die Lysozymprobe beträgt  $h=0.3$ . Dies entspricht bei

beiden Proben ungefähr einer Monolage Wasser um das Protein. Die Proben wurden in NMR Röhrchen gefüllt, welche mit Epoxidharzkleber verschlossen wurden. Dabei wurde ein Teflonband zur Trennung zwischen Probenmaterial und Kleber verwendet, um mögliche chemische Reaktionen zwischen Kleber und Probe zu verhindern. Aus den bekannten Gewichtsverhältnissen und Aminosäuresequenzen kann man die Wasser- und Proteinprotonenanteile bestimmen. Man geht dabei folgendermaßen vor:

1. Mit Hilfe der Tabelle A.1 können wir die Anzahl der Wasserstoffe im Protein ( $N_p$ ) anhand der  $N$  Aminosäuren ausrechnen. Man muss jedoch  $2(N - 1)$  Wasserstoffe abziehen, da pro Peptidbindung 1 Wassermolekül freigesetzt wird.
2. Man berechnet das Molekulargewicht  $M_{\text{prot}}$  des Proteins<sup>7</sup>. Auch hier muss man  $2(N - 1) \cdot 18.02 \text{ g/mol}$  abziehen.
3. Die Anzahl der Wasserstoffe  $N_{p,\text{Wasser}}$  im Wasser berechnet sich mit gegebenem Hydratationsgrad  $h$  zu:

$$N_{p,\text{Wasser}} = 2 \cdot \frac{h}{M_{\text{Wasser}} \text{ g/mol}} \cdot M_{\text{prot}} \text{ g/mol} \quad (3.62)$$

Pro Wassermolekül sind zwei Protonen zu zählen, daher der Faktor 2 in Formel 3.62.

Probe	$N_{p,\text{Protein}}$	$N_{p,\text{Wasser}}$	$p_p$	$p_w$	$M/\text{Da}$
L30	1092	541	0.67	0.33	16 238
M35	1217	673	0.64	0.36	17 330
M35*	$\approx 1280$	700-800	$\approx 0.65$	$\approx 0.35$	—

**Tab. 3.1.:** Anzahl der Protonen in Protein und Wasser für L30 und M35 aus den entsprechenden Aminosäuresequenzen bestimmt (siehe Tab. A.1). Die Werte für M35 stimmen gut mit den von Doster et al. genannten Werten für deren Probe (M35\*) überein<sup>[124]</sup>.

<sup>7</sup>z.B. mit dem Modul `Bio.Data.IUPACData.protein_weights` aus dem Python Modul `BioPython`.

#### 3.7.2. Spektrometer

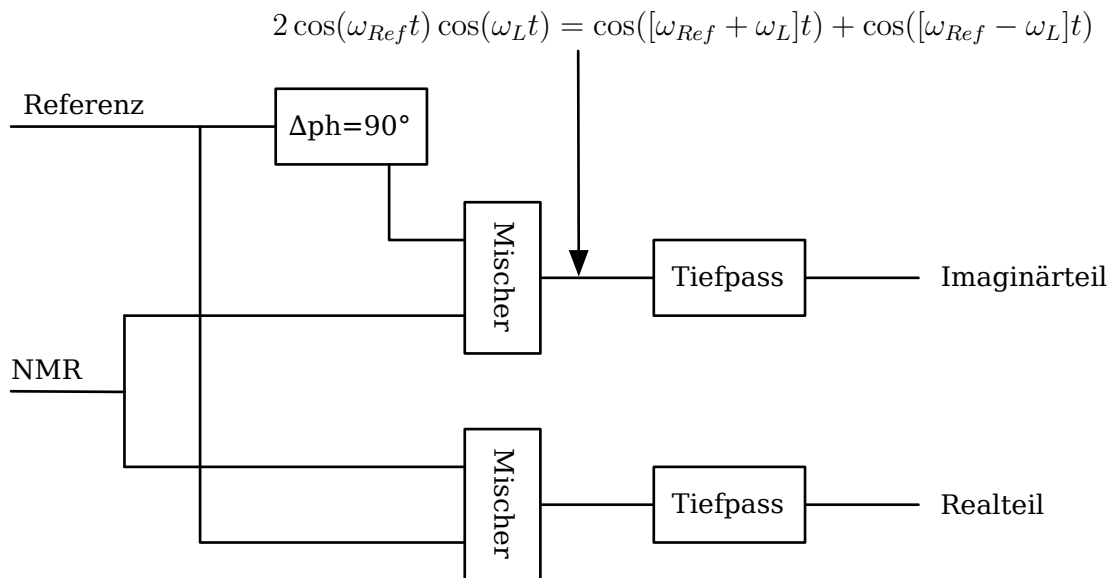
##### Steuerung

Alle verwendeten Magnete werden mit der in der AG Fujara/AG Vogel entwickelten Steuerung DAMARIS (Darmstadt MAGnetic Resonance Instrumentation Software) gesteuert<sup>[125]</sup>. Ein Frontend generiert aus Pulsprogrammen, geschrieben in der Programmiersprache Python, intermediäre „Job“-Dateien, welche vom Backend zur Programmierung der Pulskarte verwendet werden. Das Ergebnis der ADC Karte wird vom Backend in „Result“-Dateien geschrieben, welche wiederum vom Frontend mit Hilfe eines „Resultscripts“ verwertet werden. Die Pulskarte ist ein SpinCore Pulsblaster PB24-100-32k mit 100 MHz Taktfrequenz, und einer Zeitauflösung von 10 ns. Die minimale Länge eines Pulses beträgt 90 ns. Die Karte kann 32000 Instruktionen speichern. Die Analog-Digital-Wandlerkarte (ADC-Karte) stammt von Spectrum GmbH. Das verwendete Modell MI4021 mit 2 Kanälen hat eine maximale Samplingrate von 20 MHz. Die Uhren der beiden Karten sind durch eine Synchronisationsplatine synchronisiert<sup>[86]</sup>.

Die Referenzfrequenz wird bei allen Magneten von einem Programmable Test Sources PTS-310 Frequenzgenerator mit Phasensteuerung durch DAMARIS erzeugt. Kabeltreiber und Quadratur-Detektor sind in der AG Fujara/AG Vogel entwickelt und durch die institutseigene Elektronikwerkstatt aufgebaut worden. Das Funktionsprinzip der Quadraturdetektion ist in Abb. 3.17 illustriert. Die Quadraturdetektion erlaubt den Wechsel in das rotierende Koordinatensystem und man kann sowohl negative wie auch positive Frequenzen unterscheiden, da sowohl Realteil als auch Imaginärteil vorliegen.

##### Gradientenmagnet „Oxford“

Der supraleitende NMR-Magnet „Oxford“ wurde speziell für SFG-NMR-Experimente entwickelt. Durch die Anordnung der supraleitenden Spulen in Maxwell-Konfiguration, im Gegensatz zur Helmholtz-Konfiguration, wird eine sehr hohe Feldinhomogenität von max. 180 T/m erreicht. Um Gebäudeschwingungen zu dämpfen, ist der komplette Aufbau auf Luftschläuchen gelagert, deren Füllung regelmässig überprüft werden muss. Eine Ionengetterpumpe der Firma Varian übernimmt bei geeignetem Druck ( $1 \times 10^{-5}$  mbar) die Aufrechterhaltung des Vakuums, wenn die Turbopumpe abgeschaltet wird um zusätzliche Schwingungen durch den Turbopumpstand zu vermeiden.



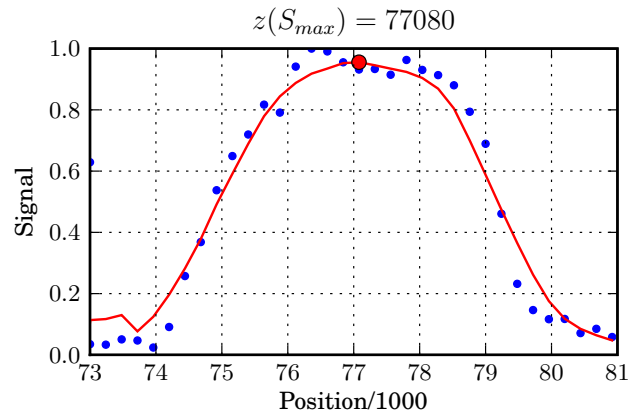
**Abb. 3.17.:** Das Prinzip der Quadraturdetektion: Das Referenzsignal mit  $\omega_{Ref}$  wird auf zwei Signalpfade aufgeteilt, wobei ein Signalpfad eine  $90^\circ$  Phasenänderung bewirkt. Diese beiden Signale werden in einem Mischer mit dem NMR-Signal multipliziert. Ein Tiefpass filtert die Summenfrequenz heraus und übrig bleiben Signale  $\cos([\omega_{Ref} - \omega_L]t)$  im oberen kHz Bereich, die von der ADC-Karte aufgenommen werden.

Ein Schrittmotor inklusive Steuerung, entwickelt von Achim Gädke<sup>[86]</sup>, wurde am „Oxford“ Gradientenmagnet aufgebaut. Damit fällt es leichter ein optimales Signal durch automatische Variation der Probenhöhe zu suchen (Abb. 3.18). Der Motor ist über eine Software ansteuerbar, die Schrittweite beträgt  $0.833 \mu\text{m}$ . Ein 2 kW RF-Verstärker liefert die Leistung, um möglichst kurze Pulse und damit eine möglichst große Anregungsschicht zu erzielen. Die Messungen wurden mit einem Gradienten von  $150 \text{ T/m}$  bei einer Larmorfrequenz von  $2\pi \cdot 99.5 \text{ MHz}$  ausgeführt, um Vergleichsmessungen am F-Praktikumsmagnet mit gleicher Larmorfrequenz durchführen zu können.

Aus bisher ungeklärten Gründen verliert der Magnet hin und wieder ein Teil seiner Feldstärke. Bei Messungen bei einem anderen Gradienten wird ausdrücklich darauf hingewiesen.

### F-Praktikumsmagnet „Alter Aachener“

Der supraleitende NMR Magnet des F-Praktikums, mit einer Larmorfrequenz von  $2\pi \cdot 99.5 \text{ MHz}$ , dient dazu Vergleichsmessungen zu den SFG Messungen durchführen zu können. Insbesondere gestalten sich  $T_1$ - und  $T_2$ -Messungen im homogenen Feld auf-



**Abb. 3.18.:** Positionsbestimmung mittels Schrittmotor bei  $\omega_L = 2\pi \cdot 99.5$  MHz. Die Gesamtbreite entspricht in Übereinstimmung mit dem Probendurchmesser 5 mm. Die durchgezogene Linie ist ein kubischer Spline.

grund des größeren Signal-Rausch-Verhältnisses leichter. Der Magnet hat allerdings ein schlechte Homogenität von ca. 20 mT/m was jedoch in Hinblick auf die zu erwartenden Diffusionskoeffizienten vernachlässigbar ist. Das Spektrometer ist ausgerüstet mit einem 1 kW RF-Verstärker.

#### PFG-Magnet „Neuer Alter Aachener“

Der „Neue Alte Aachener“ ist ein supraleitender Magnet mit einer Protonen-Larmorfrequenz von  $2\pi \cdot 300$  MHz. Die gepulsten Gradienten werden durch eine Copley Controls Model 266 Gradientenstromquelle erzeugt, welche durch einen 20bit-Digital-Analog-Konverter (DAC) über DAMARIS gesteuert wird. Die Gradientenspule von Resonance Research erzeugt einen maximalen Gradienten von 20 T/m bei 266 A und hat ein sogenanntes „Active Shielding“: Eine zweite Spule um die eigentliche Spule herum erzeugt ein Gegenfeld, um das äussere Feld während eines Gradientenpulses zu minimieren und die Erzeugung von Wirbelströme zu vermeiden<sup>[126]</sup>. Die Temperierung der Probe erfolgt durch einen Stickstoff-Gasfluss-Kryostat. Dabei wird in einem Dewar-Gefäss flüssiger Stickstoff durch eine Heizung verdampft, und das kalte Gas über einen wärmeisolierten Schlauch zum Probenkopf geleitet. Die Temperaturkontrolle erfolgt durch ein Eurotherm 2216e mit einem Typ-T-Thermoelement in der Nähe der Probe. Das Eurotherm erwärmt mit einer weiteren Heizspirale das kalte Gas, bis im Probenraum die gewünschte Temperatur erreicht ist. Die Temperaturstabilität ist  $< \pm 0.5$  K. Für weitere Details zum PFG-Magneten sei auf meine Diplomarbeit verwiesen<sup>[127]</sup>.



## Temperierung

Sowohl beim „Oxford“ als auch beim F-Praktikumsmagneten wurde zur Temperierung der Probe ein  $\text{LN}_2$ -Durchfluss-Kryostat von Oxford Instruments verwendet. Zu Steuerung der Temperatur dient ein Oxford Instruments Integrated Temperature Controller ITC503. Eine Membranpumpe saugt flüssigen Stickstoff durch eine Kapillare in den Kryostaten. Ein Wärmetauscher mit elektrischer Heizung dient der Temperaturregulierung. Die Probentemperatur wurde durch ein Platin-Widerstandsthermometer (PT100) mit Hilfe der 4-Punkt-Messung bestimmt. Durch die 4-Punkt-Messung wird der Beitrag der Zuleitungen zum Gesamtwiderstand eliminiert. Der Kryostat ist mit flüssigem Stickstoff im Bereich von 77 K bis 400 K einsetzbar.



## 4. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Messungen an den beiden Proben M35 und L30 vorgestellt.

### 4.1. Myoglobin und Wasser

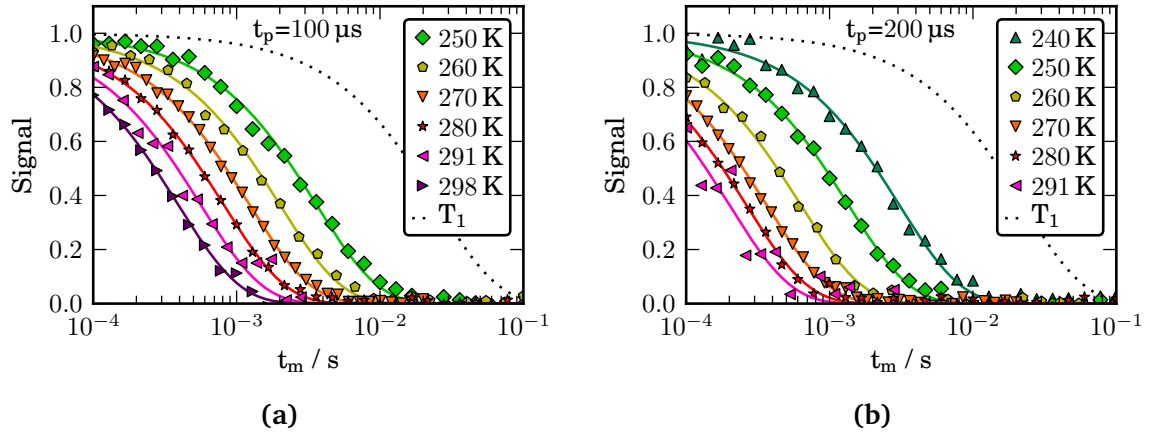
#### Myoglobin und Wasser: SFG Messungen

Zunächst werden Diffusionsmessungen am „Oxford“ SFG-Magneten betrachtet. Die Proben wurden bei einer Larmorfrequenz von  $\omega_L = 2\pi \cdot 99.5 \text{ MHz}$  und einem Gradienten  $g = 150 \text{ T/m}$  bei verschiedenen Temperaturen vermessen. Bei der verwendeten Pulssequenz, dem STE-Experiment, wurde für verschiedene Evolutionszeiten  $t_p$  die Signalhöhe in Abhängigkeit der Diffusionszeit  $t_m$  bestimmt.

Die Diffusionsmessungen von Wasser an Myoglobin mit Hydratationsgrad  $h = 0.35$  (M35) zeigen von Raumtemperatur bis hinab zu ca. 240 K einen monoexponentiellen Abfall des STE-Signals, welcher mit sinkender Temperatur langsamer wird (Abb. 4.1). Zusätzlich nimmt die Zeitkonstante des Abfalls mit Vergrößerung der Evolutionszeit  $t_p$  ab, vgl. 4.1a und 4.1b. Beide Effekte entsprechen dem erwarteten Verhalten für Diffusion (Gl. 3.49). Der Abfall des STE-Signals durch  $T_1$  ist mindestens eine Größenordnung langsamer als der Abfall durch Diffusion (4.1 gepunktete Kurve).

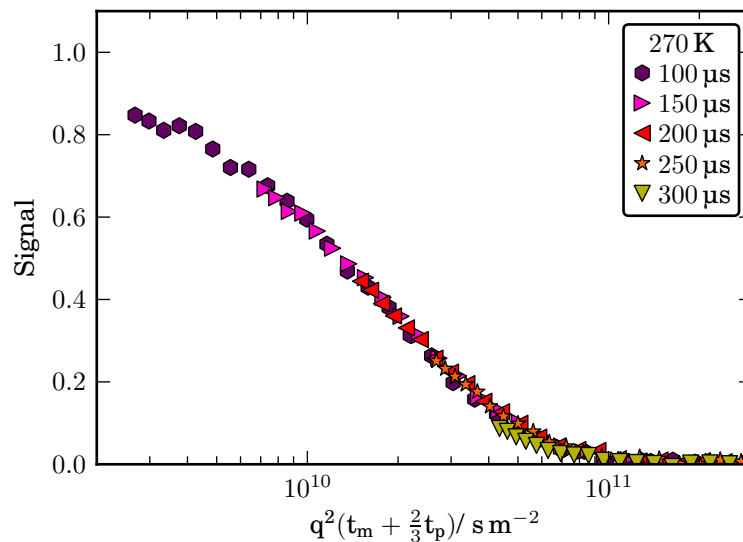
Die Vermutung von Wasserdiffusion in der Proteinmatrix als Ursache dieses Abfalls lässt sich weiter erhärten, indem das STE-Signal bei konstanter Temperatur und für verschiedene  $t_p$  über

$$b = (\gamma g t_p)^2 \cdot \left(t_m + \frac{2}{3} t_p\right) \quad (4.1)$$



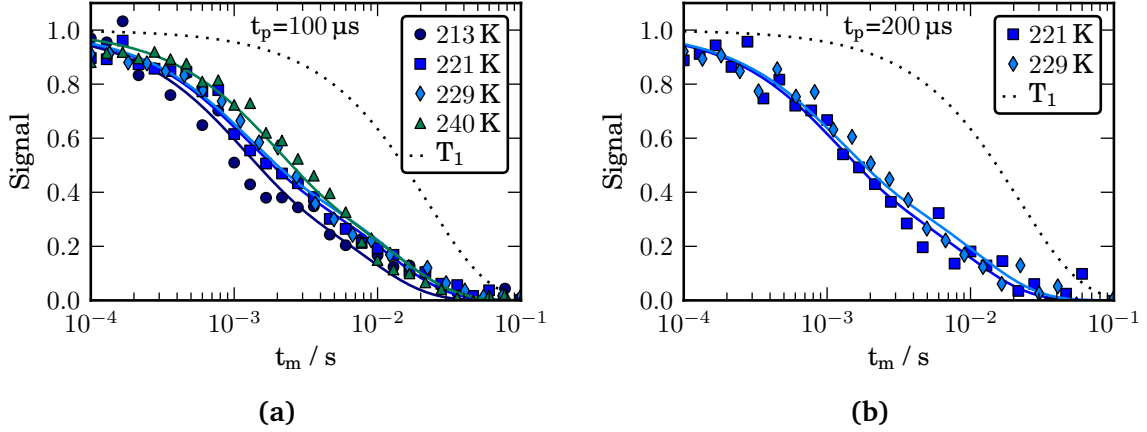
**Abb. 4.1.:** STE-Signal von Wasser der M35 Probe im SFG in Abhängigkeit von  $t_m$  bei Temperaturen  $T \geq 240$  K und verschiedenen Evolutionszeiten: (a)  $t_p = 100 \mu\text{s}$  und (b)  $t_p = 200 \mu\text{s}$ . Das STE-Signal fällt mit sinkender Temperatur langsamer ab, ein Anzeichen für Diffusion. Die gestrichelte Linie zeigt den Magnetisierungsabfall durch  $T_1$  bei der höchsten Temperatur, dessen Wert im homogenen Feld durch eine Sättigungspulsfolge bestimmt wurde. Durchgezogene Linien sind Fits an das Modell der normalen Diffusion (Gl. 3.49).

aufgetragen wird. Unter der Voraussetzung freier Diffusion erhält man durch die Skalierung eine Überlagerung aller Kurven zu einem vom Diffusionskoeffizienten  $D$  bestimmten exponentiellen Verlauf (Gl. 3.49). In Abb. 4.2 kann man die sehr gute Überlagerung der Kurven zu einer Masterkurve erkennen. Während der Abfall des Echos oberhalb  $T' = 237$  K sehr gut mit der bekannten Gleichung von Hahn zur Diffusion bei konstan-



**Abb. 4.2.:** Der STE Abfall für verschiedene  $t_p$  bei 270 K. Die Kurven bilden durch die Skalierung eine Masterkurve.

tem Hintergrundgradienten beschrieben werden kann, gibt der Verlauf unterhalb  $T'$  zunächst Rätsel auf (Abb. 4.3). Unterschreitet man  $T'$ , beobachtet man in Abb. 4.3



**Abb. 4.3.:** STE-Abfälle von M35 im SFG bei Temperaturen  $T < 240$  K für (a)  $t_p = 100 \mu s$  und (b)  $t_p = 200 \mu s$ . Bei sinkender Temperatur wächst eine Schulter heraus und die Hauptkomponente zerfällt *schneller*. Dieses Temperaturverhalten zeigt, dass Diffusion alleine nicht für den Zerfall verantwortlich ist, sondern dass in unserem Fall Kreuzrelaxation zwischen der Wasser- und Protein-Magnetisierung bei diesen Temperaturen dominiert. Die Höhe der Stufe entspricht dem Verhältnis von Wasser- zu Proteinprotonen. Durchgezogene Linien sind Fits an das Modell von Peschier<sup>[78]</sup>. Die gepunktete Linie zeigt den Abfall durch Spin-Gitter-Relaxation bei der höchsten Temperatur an.

*zusätzlich* eine Schulter, während die Hauptkomponente mit sinkender Temperatur *schneller* abfällt (Abb. 4.3). Diffusion als Ursache des ungewöhnlichen STE Verlaufs scheint nicht intuitiv, da kein Mechanismus vorstellbar ist, der Diffusion bei Abkühlung beschleunigt.

Trägt man für unterschiedliche  $t_p$  den Signalverlauf abhängig von  $t_m$  auf (Abb 4.4), das bedeutet die Abszisse ist nun *unskaliert*, so fällt einem die Unabhängigkeit von  $t_p$  auf, was ebenfalls nicht mit freier Diffusion in Einklang zu bringen ist.

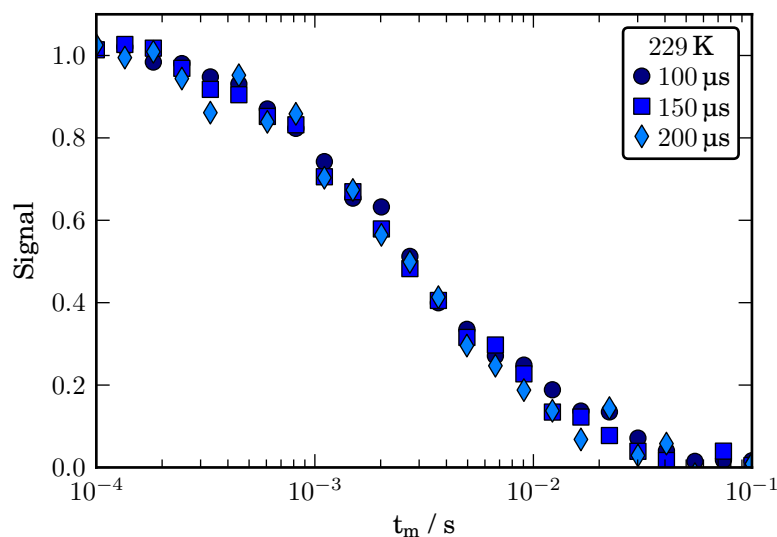
Es wurden mehrere Erklärungsversuche unternommen, um das Auftreten der Stufe oder des Temperaturverlaufs der Hauptkomponente zu begründen. Eine Möglichkeit die Stufe zu erklären wäre z.B. eingeschränkte Diffusion<sup>[110]</sup>. Jedoch sind die zu erwartenden Strukturen der Probe aufgrund des Proteindurchmessers von max. 5 nm trotz des großen Feldgradienten von 150 T/m weit unterhalb der Auflösungsgrenze des SFG ( $l = 2\pi \cdot (\gamma g t_p)^{-1} \approx 0.5 \mu m$ ), weshalb diese These verworfen wurde. Zudem sollten bei eingeschränkter Diffusion auch die Daten für Temperaturen  $T > 240$  K eine  $q$ -

Abhängigkeit aufweisen.

Eine weitere Erklärung für Stufe und Temperaturverlauf, wäre eventuell vorhandene Restdipolkopplung, siehe Abschnitt 3.6. Jedoch ergibt sich für die Beschreibung durch Restdipolkopplung kein stimmiges Bild insbesondere im Hinblick auf Messungen im homogenen Feld. Im folgenden Abschnitt wird auf diese Punkte und die Erklärung der Effekte im Rahmen von Kreuzrelaxation genauer eingegangen und die Effekte auf Kreuzrelaxation zurückgeführt.

### Myoglobin und Wasser: Messungen im homogenen Feld

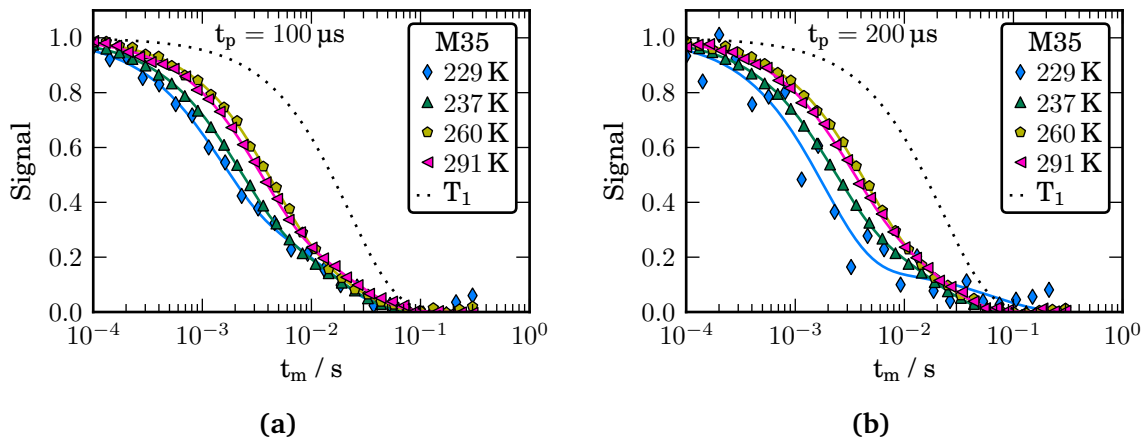
Um Diffusionskoeffizienten für niedrigere Temperaturen zu erhalten und den Einfluss der Kreuzrelaxation auf die Werte im oberen Temperaturbereich zu untersuchen, wurden zusätzliche Messungen im homogenen Feld des „Alten Aachener“ Magneten durchgeführt. Ein großer Vorteil dabei ist die gleiche Larmorfrequenz der beiden Magneten, was einen direkten Vergleich der Messungen in beiden Magneten erlaubt, und zwar einmal mit und einmal ohne statischen Magnetfeldgradienten. Besonders die Bestimmung von  $T_1$  erweist sich im homogenen Feld als bedeutend einfacher und genauer als im statischen Feldgradienten. Dafür verantwortlich ist das deutlich stärkere Signal im homogenen Feld, was eine kurze Messzeit bei hohem Signal-Rausch-Verhältnis erlaubt. Als Methode der Wahl wurde hier das Saturation-Recovery-Experiment zur Bestimmung von



**Abb. 4.4.:** Die  $t_p$ -Unabhängigkeit des STE Abfalls im SFG bei 229 K schließt einen Abfall durch Diffusion aus.

$T_1$  verwendet. Das so bestimmte  $T_1$  ist allerdings ein *mittleres*  $T_1$ , da die intrinsischen Spin-Gitter-Relaxationszeiten von Protein- und Wasserprotonen aufgrund der, über der Zeitskala des Experiments sehr effizienten, Spindiffusion gemittelt werden. Eine Möglichkeit zur Trennung der beiden Komponenten wäre die selektive Anregung der Wasserprotonen durch einen sog. „weichen“ Puls, d.h. man regt nur den Wasseranteil des Spektrums an.<sup>[75,115]</sup> Hierauf wird aber in dieser Arbeit nicht eingegangen, da das verwendete Spektrometer keine Möglichkeit zur Pulsformung aufweist.

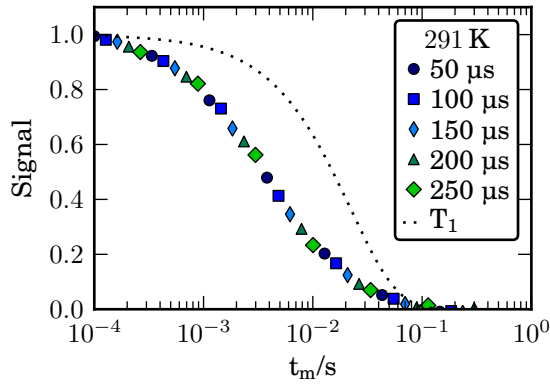
Die STE-Experimente wurden mit dem identischen Pulsprogramm und mit den gleichen Einstellung wie im statischen Feldgradienten durchgeführt.



**Abb. 4.5.:** STE-Signal von M35 im homogenen Feld des „Alten Aachner“ Magneten bei verschiedenen Evolutionszeiten: (a)  $t_p = 100 \mu\text{s}$  und (b)  $t_p = 200 \mu\text{s}$ . Man erkennt die schwache Temperaturabhängigkeit der STE-Abfälle. Die gepunktete Kurve ist das  $T_1$  der Probe bei 291 K.

In Abb. 4.5 ist das STE-Signal in Abhängigkeit von  $t_m$  für unterschiedliche  $t_p$  gezeigt. Der Zerfall der Magnetisierung im STE ist deutlich schneller als durch Spin-Gitter-Relaxation zu erwarten wäre (gepunktete Linie in Abb. 4.5). Wie in Abschnitt 3.5 dargestellt wurde, wird während  $t_m$  durch Kreuzrelaxation Magnetisierung der Wasserprotonen auf Proteinprotonen übertragen. Die Proteinmagnetisierung ist aufgrund ihrer kurzen Spin-Spin-Relaxationszeit ( $T_{2,p} \approx 30 \mu\text{s}$ ) zum Zeitpunkt des Echos wieder vollständig zerfallen und trägt nicht mehr zum Signal bei.

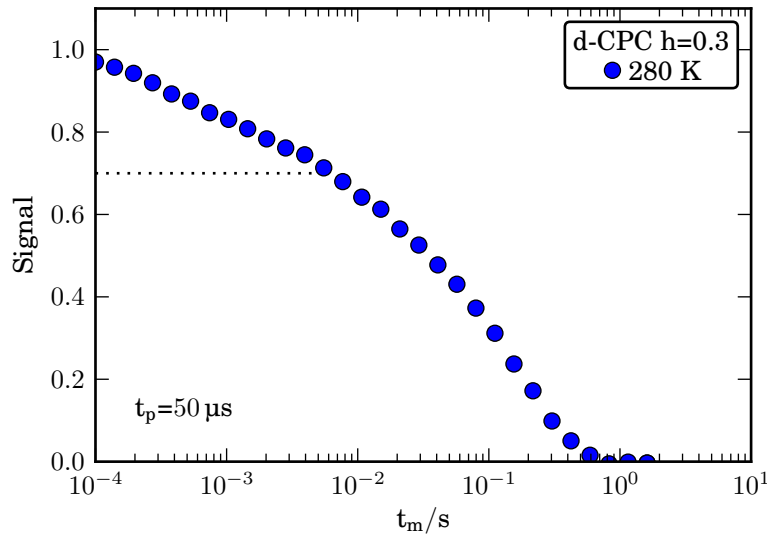
Für lange Mischzeiten  $t_m$  erwartet man ein Magnetisierungsgleichgewicht der beiden Komponenten, was zu einer Stufe in der  $t_m$  Abhängigkeit des STE führt. Die Höhe der Stufe im STE-Verlauf entspricht dabei dem Anteil der Wasserprotonen, siehe Abschnitt 3.5. Man kann in Abb. 4.5 und 4.6 ab ca.  $t_m = 10 \text{ ms}$  den Ansatz einer Stufe erkennen.



**Abb. 4.6.:** STE-Signal im homogenen Feld bei 291 K und verschiedenen Evolutionszeiten  $t_p$  für M35. Die gepunktete Kurve gibt den Verlauf wieder, der aufgrund von Signalverlust durch Spin-Gitter-Relaxation ( $T_1$ ) erwartet wird.

Die Höhe dieser Stufe ( $\approx 0.25$ ) stimmt gut mit dem aus der Theorie vorhergesagten Wert ( $\approx 0.3$ ) überein. Aufgrund des kurzen  $T_1$  des Myoglobins ( $\approx 30$  ms), vermutlich durch das paramagnetische Eisen der Häm-Gruppe hervorgerufen, ist diese Stufe im Vergleich zur Lysozym-Probe (s.u.) jedoch nur schwach ausgeprägt. Bei Vergleich von Abb. 4.5a und 4.5b erkennt man, dass der Verlauf des STE-Signals *unabhängig* von der Evolutionszeit  $t_p$  ist. Um dies zu verdeutlichen ist in Abb. 4.6 die  $t_p$ -Abhängigkeit des STE bei  $T = 291$  K für mehrere  $t_p$  aufgetragen. Durch Verwendung eines deuterierten

statt protonierten Proteins lässt sich die Hypothese des Einflusses von Kreuzrelaxation testen. Im Rahmen der Kreuzrelaxation ist eine Erhöhung der Stufe im Einklang mit einer Erhöhung des Anteils der Wasserprotonen durch Verwendung eines deuterierten



**Abb. 4.7.:** STE-Signal im homogenen Feld für Wasser in einer voll-deuterierten C-Phycocyanin-Matrix. Die Höhe der Stufe entspricht dem Wert der Vorhersage (gepunktete Linie).

statt protonierten Proteins. Dahingegen sollte die Höhe der Stufe bei Restdipolkopplung weitgehend unabhängig vom Deuterierungsgrad des Proteins sein. Für die Untersuchung stand eine per-deuterierte Proteinprobe von C-Phycocyanin (d-CPC) mit Hydratationsgrad  $h = 0.3$  zur Verfügung.



Durch Analyse der Aminosäuresequenz<sup>1</sup> erhält man die Anzahl der austauschbaren Protonen von d-CPC. Unter der Annahme, dass im Gleichgewicht die Konzentration der austauschbaren Deuteronen im Wasser und Protein gleich ist, erhält man für den Anteil der Protonen im Wasser  $p_w = 0.7$  (Details zur Bestimmung siehe Anhang). Wie in Abb. 4.7 für ein STE-Experiment der d-CPC Probe im homogenen Feld zu erkennen ist, ist das Plateau für Zeiten deutlich höher als für protonierte Protein, was die Hypothese der Kreuzrelaxation weiter erhärtet. Genauer betrachtet scheint die Stufe etwas höher zu sein als theoretisch erwartet (ca.  $p_w = 0.8$ ). Dies ist vermutlich auf das kurze  $t_p$  von  $50\mu\text{s}$  zurückzuführen, wodurch die Magnetisierung der Protonen am Protein noch nicht komplett zerfallen ist (typ.  $T_2 \approx 30\mu\text{s}$ ) und dadurch noch einen kleinen Beitrag zur Echohöhe liefert, vgl. Abb. 3.14.

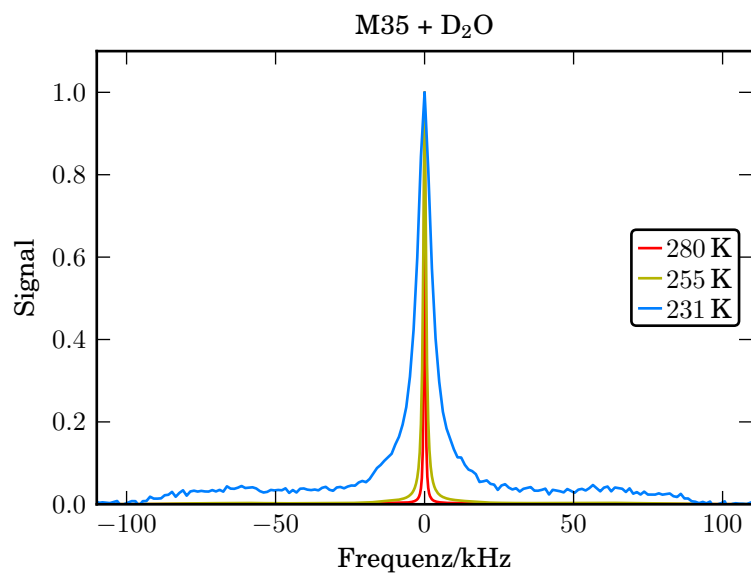
Weitere Hinweise gegen Restdipolkopplung als Ursache der Stufe liefern  $^2\text{H}$ -Messungen von deuteriertem Wasser in einer Myoglobinmatrix mit gleichem Hydratationsgrad  $h = 0.35$  von Sorin Lusceac. Falls Restdipolkopplung bei protonierten Wasser vorhanden ist, sollte sie zu einer Restquadrupolkopplung in deuteriertem Wasser führen, so dass man in  $^2\text{H}$ -Spektren ein sogenanntes Pakespektrum auch bei Raumtemperatur erwarten würde. Dies kann jedoch aufgrund von  $^2\text{H}$ -Messungen<sup>2</sup> im betreffenden Temperaturbereich von 230–300 K ausgeschlossen werden (Abb. 4.8). Bei Raumtemperatur findet man ein lorenzförmiges Spektrum mit einer Halbwertsbreite von 300 Hz. Bis 230 K dominiert diese Lorenzlinie das  $^2\text{H}$ -Spektrum was auf isotrope Rotationsdynamik schließen lässt, die schneller als die inverse Quadrupol-Kopplungskonstante ist:

$$\delta^{-1} = (2\pi \cdot 160\text{ kHz})^{-1} \approx 1\mu\text{s}. \quad (4.2)$$

Im STE-Experiment sollte aus diesem Grund im Hochtemperaturbereich keine Restkopplung mehr vorhanden sein.

<sup>1</sup>Die Analyse wurde für *eine* der Helices durchgeführt. Aufgrund der Ähnlichkeit der verschiedenen Helices skaliert das Ergebnis auf das gesamte d-CPC-System.

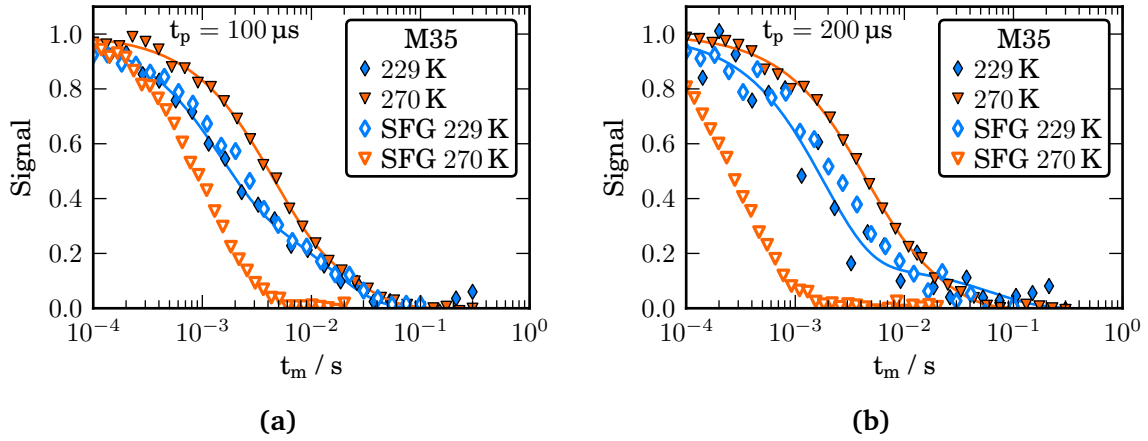
<sup>2</sup>Unveröffentlichte Messungen von Sorin Lusceac.



**Abb. 4.8.:**  $^2\text{H}$ -Spektren von M35. Die Halbwertsbreite des Spektrums bei 280 K beträgt 300 Hz, dies entspricht in etwa der maximalen Spektrometerauflösung. Das Plateau bei 231 K ist ein Pakespektrum niedriger Intensität und stammt von den Deuteronen an den austauschbaren Plätzen des Proteins.

### Vergleich der Messungen im homogenen Feld und SFG

Ein Vergleich der Messungen von M35 im SFG mit den Ergebnissen aus dem homogenen Feld bei verschiedenen Temperaturen ist in Abb. 4.9 gezeigt. Bei 229 K lässt sich keine Diffusion mehr feststellen, während bei 270 K die Diffusion den STE-Abfall dominiert.



**Abb. 4.9.:** Vergleich des STE-Signal im statischen Feldgradienten ( $g = 150 \text{ T/m}$ , leere Symbole) mit dem STE-Signal des Experiments im homogenen Feld (volle Symbole) für (a)  $t_p = 100 \mu\text{s}$  und (b)  $t_p = 200 \mu\text{s}$ . Durchgezogene Linien sind Fits an das Modell von Peschier. Bei  $T = 270 \text{ K}$  ist der schnellere Abfall durch Diffusion klar erkennbar (offene Dreiecke), während bei  $T = 229 \text{ K}$  kein Unterschied mehr erkennbar ist.

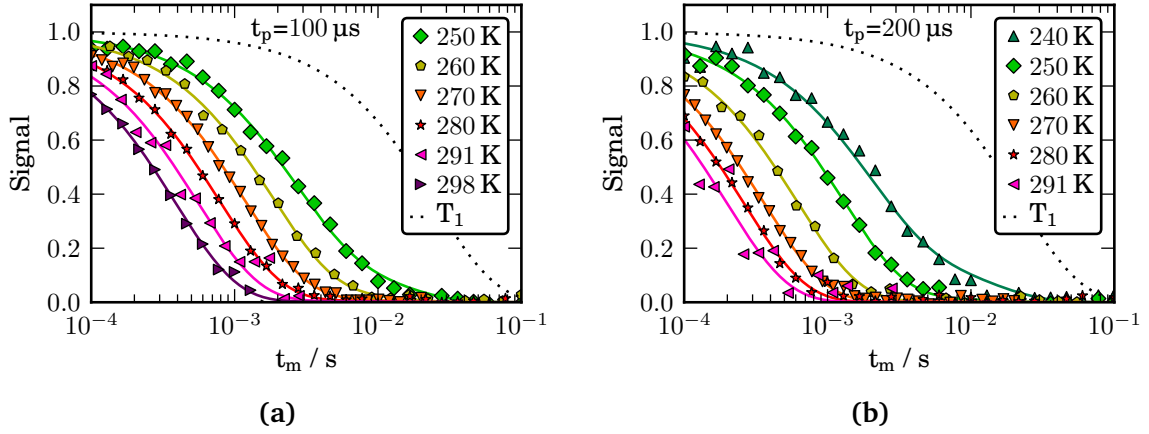
### Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Wasser in M35

Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Wasser in einer Proteinmatrix unter dem Einfluss von Kreuzrelaxation wurde nach folgendem Auswerteprotokoll vorgegangen. Die Parameter  $k_w$ ,  $k_p$  und  $T_{1,p}$  des Peschier-Modells (vgl. Abschnitt 3.5) werden zunächst anhand der STE-Messungen im homogenen Feld des „Alten Aachener“-Magnetens bestimmt, indem Gl. 3.60 an die Daten angepasst wird. Um die Zahl der Fitparameter zu reduzieren wird dabei angenommen, dass das  $T_1$  aus Saturation-Recovery-Experimenten durch das intrinsische  $T_1$  der Wasserprotonen bestimmt wird:

$$T_1 \simeq T_{1,w} \quad (4.3)$$

Die Fits sind in Abb. 4.5) als durchgezogene Linien dargestellt und geben den Verlauf der Messdaten sehr gut wieder. Mit diesen Parametern lassen sich nun die STE-Messungen

im SFG mit dem Peschier-Modell anfitten. Dabei bleibt als freier Parameter neben der Anfangsamplitude  $S_0$  des Signals nur noch der Diffusionskoeffizient  $D$ . Der Einfluss



**Abb. 4.10.:** STE-Signal im statischen Feldgradienten ( $g = 150 \text{ T/m}$ ) bei  $T > 240 \text{ K}$  für (a)  $t_p = 100 \mu\text{s}$  und (b)  $t_p = 200 \mu\text{s}$ . Die gepunktete Linie zeigt den Magnetisierungsabfall durch  $T_1$  bei der höchsten Temperatur, dessen Wert im homogenen Feld durch eine Sättigungspulsfolge bestimmt wurde. Durchgezogene Linien sind Fits an das Modell von Peschier (Details siehe Text). Als Fitparameter dienen nur die Anfangsamplitude  $S_0$  und der Diffusionskoeffizient  $D$ .

der Kreuzrelaxation auf den Abfall durch Diffusion erscheint auf den ersten Blick, zumindest bei Temperaturen  $T > 240 \text{ K}$ , vernachlässigbar. Ein optischer Vergleich der Anpassungen mit dem Modell der normalen Diffusion (Abb. 4.1) und dem Modell von Peschier (Abb. 4.10) zeigt kaum Unterschiede, beide Fits geben die Daten sehr gut wieder. Zur genaueren Betrachtung sind die Werte in Abb. 4.11 für zwei Evolutionszeiten  $t_p$  dargestellt. Wie man erkennt, wächst mit fallender Temperatur das Verhältnis  $D_{\text{app}}/D$  an, was mit effizienter werdender Kreuzrelaxation aufgrund langsamerer Dynamik zusammenhängt. Zudem ist der Diffusionskoeffizient  $D_{\text{app}}$  systematisch größer als der nach dem Modell von Peschier bestimmte Koeffizient  $D$ , und zwar in stärkerem Maße je kleiner  $t_p$  ist (Abb. 4.11). Dieses Verhalten wiederum liegt an der  $t_p^2$ -Abhängigkeit des Signalverlusts durch Diffusion, sodass mit längerem  $t_p$  der Diffusionsanteil zum Gesamtabfall größer ist.

In Abb. 4.12 sind die Resultate der Diffusionsmessungen im SFG in der Darstellung  $D^{-1}$  über  $1000/T$  aufgetragen. Die Diffusionskoeffizienten zeigen ein Vogel-Fulcher-Tammann-Verhalten mit den Parametern  $1/D_0 = 4.59$ ,  $c = 1.36(4)$  und  $T_0 = 202(1) \text{ K}$ .

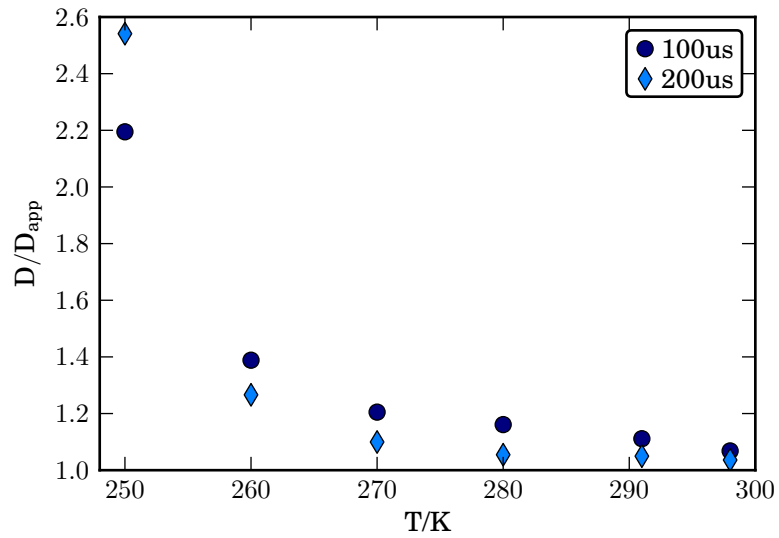


Abb. 4.11.: Verhältniss  $D/D_{\text{app}}$  als Funktion der Temperatur

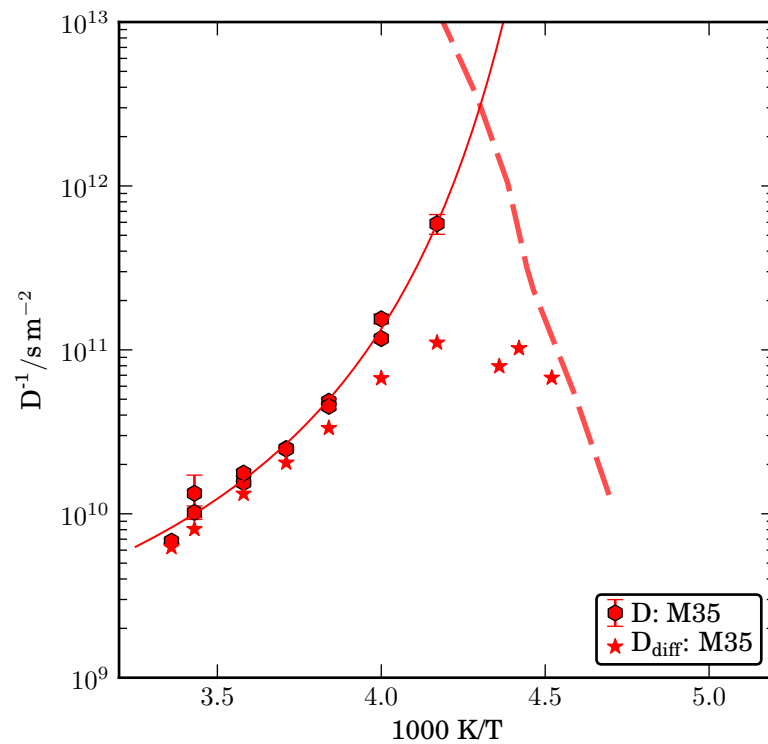


Abb. 4.12.:  $D^{-1}$  aufgetragen über  $1000/T$ . Sterne sind SFG-STE-Daten mit dem Modell der freien Diffusion gefittet. Volle Kreise sind SFG-STE-Daten nach dem entwickelten Auswerteprotokoll unter Berücksichtigung der Kreuzrelaxation. Die durchgezogene Linie ist ein Vogel-Fulcher-Tammann-Fit an die Diffusionskoeffizienten.

### Abschätzung des Arbeitsbereichs des SFG-STE-Experiments

Um eine Aussage treffen zu können, bis zu welchen Temperaturen Diffusion noch gemessen werden kann, muss man den komplexen Zusammenhang der Echohöhe mit der Spin-Spin- und Spin-Gitter-Relaxationszeit, sowie der Kreuzrelaxation und Diffusion betrachten.

Zunächst der limitierende Faktor durch Spin-Spin-Relaxation  $T_2$ . Das Signal wird im STE im ersten und letzten Zeitintervall jeweils durch  $T_2$  gedämpft, d.h. insgesamt dephasieren die Spins für  $2 \cdot t_p$  mit der Spin-Spin-Relaxationszeit. Als Grenze, bei der ein Signal noch messbar ist, wurde angenommen, dass es nicht mehr als um  $3T_2 \hat{=} 1 - \exp(-3) = 95\%$  abgefallen sein sollte. Dies ergibt als obere Grenze für die Evolutionszeit  $t_{p,\max} = \frac{3}{2}T_2$ . Um Diffusionskoeffizienten bestimmen zu können, sollte das verbleibende Echosignal aufgrund von Diffusion auf  $1/e$  abgefallen sein:

$$S(t_{m,\max}) = \exp\left(-\gamma^2 g^2 t_{p,\max}^2 \left[t_m + \frac{2}{3}t_{p,\max}\right] D_{\min}\right) := \frac{1}{e} \quad (4.4)$$

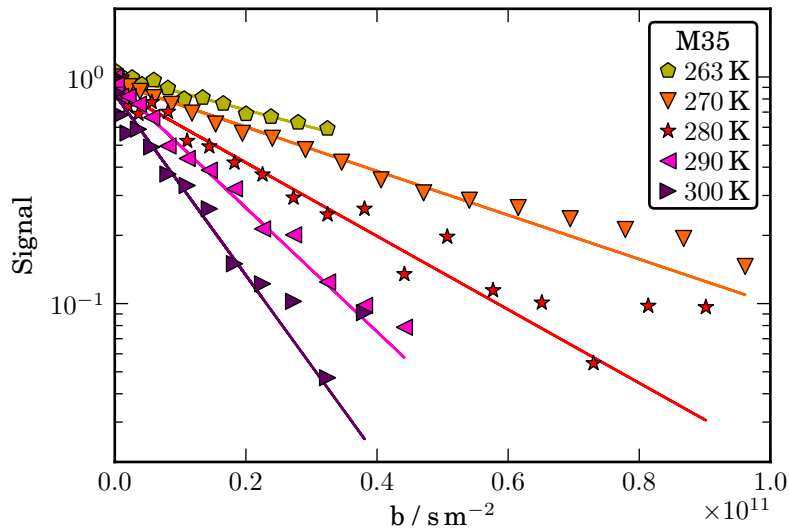
Da der Gradient  $g$  und, durch  $T_2$ , ein maximales  $t_{p,\max}$  vorgegeben sind, kann der Abfall nur durch die Diffusionszeit  $t_m$  erfolgen. Die maximale Diffusionszeit  $t_{m,\max}$  wiederum ist beschränkt durch die Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$ . Im vorliegenden Fall von Protein-Wasser-Mischungen wird sie durch den Einfluss von Kreuzrelaxation noch weiter verringert ( $R_1^{-1} < T_1$ ). Man erhält einen kleinsten Diffusionskoeffizienten  $D_{\min}$  durch Ersetzen von  $t_{m,\max}$  durch  $R_1^{-1}$  in Gl. 4.4:

$$1/D_{\min} = \gamma^2 g^2 t_{p,\max}^2 \left(R_1^{-1} + \frac{2}{3}t_{p,\max}\right) \quad (4.5)$$

Der Verlauf dieser Grenze ist für die Probe M35 und dem verwendeten Gradienten  $g = 150 \text{ T/m}$  in Abbildung 4.12 rot gestrichelt dargestellt. Unter diesen Umständen ist für die Probe M35 die niedrigste Temperatur, bei der ein Diffusionskoeffizient *zuverlässig* bestimmt werden kann ca. 240 K. Somit ist mit diesem System eine Untersuchung des Temperaturverhaltens der langreichweitigen Translationsdynamik des Wassers bei Unterschreiten der postulierten kritischen Temperatur von ca. 220 K mit der Methode der magnetischen Feldgradienten NMR *nicht möglich*.

### 4.1.1. PFG-STE-Experimente an M35

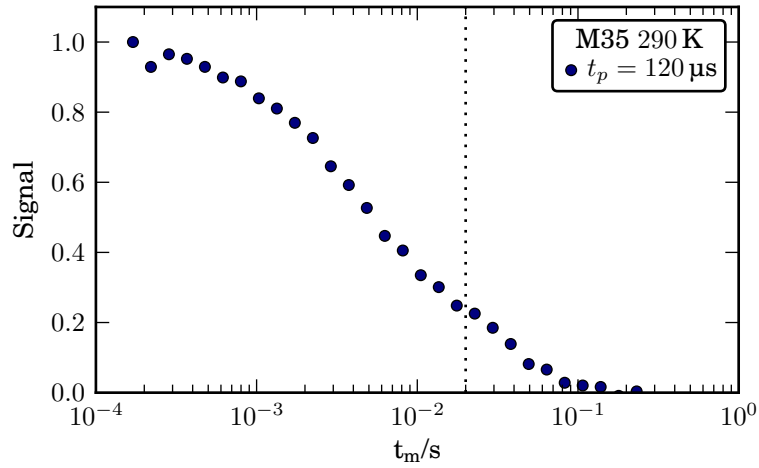
Messungen mit PFG-NMR wurden am Spektrometer „Neuer Alter Aachener“ mit 300 MHz Protonenfrequenz durchgeführt. Ein  $\sin^2$ -förmiger Gradient der Länge  $\delta = 0.65$  ms wurde bei konstant gehaltenem  $t_p$  und  $t_m$  von  $G = 0 - 4$  T/m variiert und die Signalamplitude aufgenommen. Die Evolutionszeit  $t_p = 1.8$  ms wurde so kurz wie möglich gewählt, ohne zusätzliche Dämpfung des Signals durch Artefakte (Wirbelströme, etc.) zu erzeugen. Anhand von Literaturdaten<sup>[74]</sup> wurde  $t_m$  so gewählt, dass das Signal beim größten Gradienten  $G = 4$  T/m um ca. 50% abgefallen sein sollte:  $t_m > 20$  ms. Die PFG-STE-Signale sind in Abb. 4.13 logarithmisch und normiert auf  $S_0 = S(g = 0 \text{ T/m})$  über den Reduktionsfaktor  $b$  (siehe Gl. 3.51) bei verschiedenen Temperaturen aufgetragen. Die Daten lassen sich sehr gut mit einem monoexponentiellen Abfall anpassen (durchgezogene Linien).



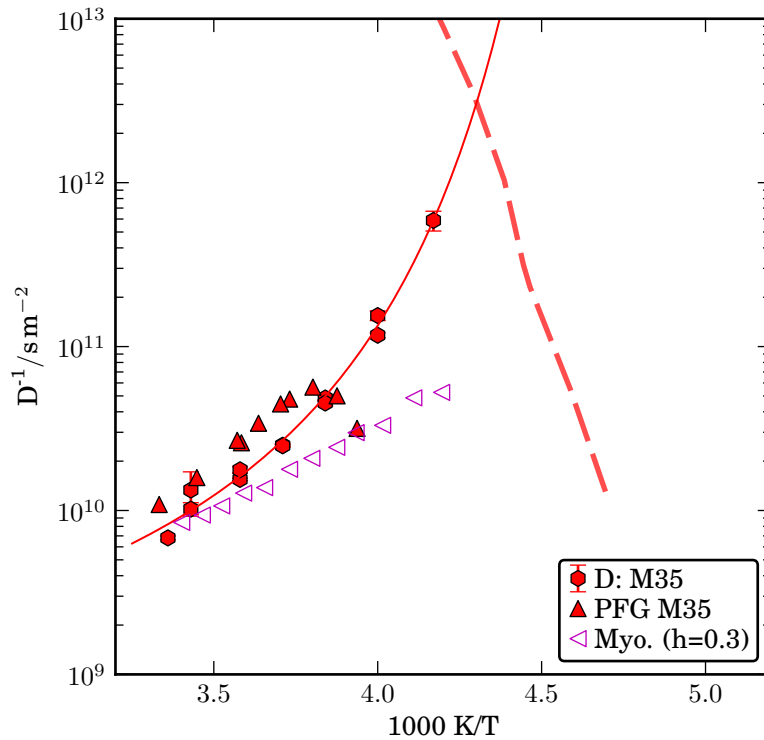
**Abb. 4.13.:** PFG-STE-Abfälle von M35 für verschiedene Temperaturen. Die durchgezogenen Linien sind Fits an Gleichung 3.51. Experimentelle Parameter: Evolutionszeit  $t_p = 1.8$  ms, PFG Pulslänge  $\delta = 0.65$  ms, Diffusionszeit  $t_m = 20 - 30$  ms.

Die inversen Diffusionskoeffizienten aus den Fits an die Daten in Abb. 4.13 finden sich in Abb. 4.15, aufgetragen über der reziproken Temperatur.

Die Resultate der PFG-STE-Messungen verwundern zunächst, da der Diffusionskoeffizient zu niedrig erscheint. Dies liegt am Zusammenspiel der Kreuzrelaxation mit der Diffusion: Alle PFG-STE-Messungen wurden bei einem konstanten  $t_m > 20$  ms durchge-



**Abb. 4.14.:** STE-Signal durch Kreuzrelaxation im PFG-Magneten ohne Gradientenpulse für  $t_p = 120 \mu s$  bei 290 K. Die gestrichelte Linie gibt das kleinste  $t_m$  der PFG-Messungen an (20 ms).



**Abb. 4.15.:**  $D^{-1}$  aufgetragen über  $1000 K/T$ . Volle Dreiecke sind Diffusionskoeffizienten aus PFG-STE-Messungen, volle Kreise sind Diffusionskoeffizienten aus SFG-STE-Messungen nach dem entwickelten Auswerteprotokoll unter Berücksichtigung der Kreuzrelaxation. Offene Symbole sind PFG-STE-Literaturdaten<sup>[74]</sup> zum Vergleich. Die Fehlerbalken entsprechen der Symbolgröße. Die durchgezogene Linie ist ein Vogel-Fulcher-Tammann-Fit an die SFG Daten.

führt. Ab genau dieser Mischzeit  $t_m$  ist das Signal aber auf dem Gleichgewichtsplateau der Kreuzrelaxation (Abb. 4.14) und durch stärker werdende Gradientenpulse wird die-



ses Plateau aufgrund von Diffusion zwar erniedrigt, jedoch geschieht dies langsamer als durch normale Diffusion erwartet. Der Diffusionskoeffizient erscheint dadurch kleiner (siehe Abschnitt 3.5).

PFG-STE-Daten von Kimmich et al. für Myoglobin mit  $h=0.3$  sind ebenfalls in Abb. 4.15 dargestellt<sup>[74]</sup>. In der Publikation wird notiert, dass eine Diffusionszeit  $t_m = 10$  ms verwendet und nur die Gradientenstärke variiert wurde.

## 4.2. Lysozym und Wasser

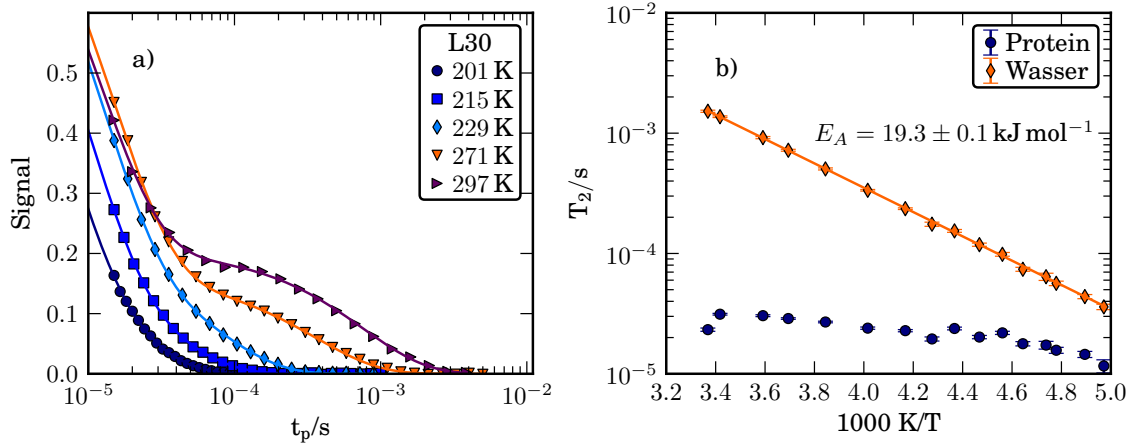
Da der Effekt der Kreuzrelaxation für die Myoglobinprobe verstanden, und ein Auswerteprotokoll etabliert wurde, konnten Messungen an Lysozym mit einem Hydratationsgrad  $h = 0.3$  durchgeführt und analog ausgewertet werden. Für dieses System, im Folgenden L30 genannt, sind PFG-Hahn-Echo-Messungen in der Literatur vorhanden, welche Diffusionskoeffizienten im Temperaturbereich von 350 K bis 200 K liefern<sup>[30]</sup> und einen Fragil-Stark-Übergang der Translationsdynamik bei 223 K nahelegen. Aufgrund der längeren Spin-Gitter-Relaxationszeit des Lysozym-Wasser-Systems, und nicht zuletzt durch die veröffentlichten Daten, bestand die Hoffnung, mit diesem System Diffusionskoeffizienten unter  $T_x = 223$  K bestimmen und Aussagen über die Existenz eines Fragil-Stark-Übergangs überprüfen zu können.

### Lysozym und Wasser: Messungen im homogenen Feld

Zunächst wurden im homogenen Feld am „Alten Aachener“-Magneten mit einem Hahn-Echo-Experiment die Spin-Spin-Relaxationszeiten  $T_2$  im Temperaturbereich von 200–300 K bestimmt. Die Evolutionszeit  $t_p$  wurde zwischen  $12\mu\text{s}$  und  $6\text{ ms}$  variiert. Wie in Abb. 4.16a zu sehen ist, kann der Signalverlauf durch einen bi-exponentiellen Abfall beschrieben werden,

$$S(t_p) = S_0 \left[ p_w \cdot \exp(-2t_p/T_{2,w}) + (1 - p_w) \exp(-2t_p/T_{2,p}) \right] \quad (4.6)$$

mit  $p_w$  dem Wasseranteil der Probe sowie  $T_{2,w}$  und  $T_{2,p}$  den Spin-Spin-Relaxationszeiten der Wasser- bzw. Proteinprotonen. Die schnell abfallende Komponente entspricht dabei dem  $T_2$  der Proteinprotonen, die langsam abfallende Komponente dem  $T_2$  der Wasserprotonen. Durchgezogene Linien in Abb. 4.16a sind Fits von Gleichung 4.6 an die Daten, normiert auf die Amplitude  $S_0$  aus dem Fit. Die Ergebnisse der Anpassung sind in Abb. 4.16b dargestellt. Die Dynamik der Wasserprotonen folgt einem Arrhenius-Gesetz mit einer Aktivierungsenergie  $E_A = 19.3(1)\text{ kJ/mol}$ , das  $T_2$  verringert sich mit sinkender Temperatur um zwei Größenordnungen von  $2\text{ ms}$  bei  $300\text{ K}$  auf  $20\mu\text{s}$  bei  $200\text{ K}$ , siehe Abb. 4.16b. Dies erscheint plausibel und ist vergleichbar mit der Aktivierungsenergie für das Aufbrechen von Wasserstoff-Brücken-Bindungen,  $E_{A,\text{HB}} \approx 18\text{ kJ/mol}$ . Die Spin-Spin-Relaxationszeit der Proteinprotonen reduziert sich im betrachteten Temperaturbereich lediglich um einen Faktor 2 von  $30\mu\text{s}$  auf  $15\mu\text{s}$  (Abb. 4.16b). Das  $T_2$  des Wassers

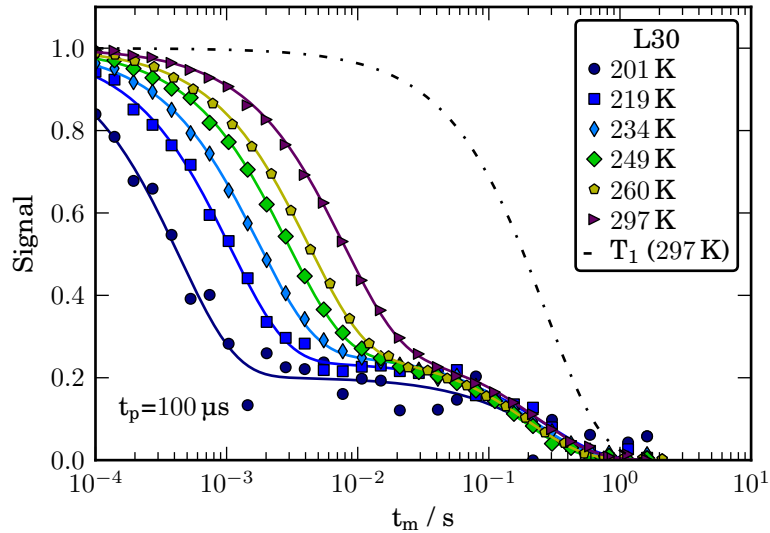


**Abb. 4.16.:** a) Verlauf der Signalamplitude für das Hahn-Echo-Experiment im homogenen Feld zur Bestimmung von  $T_2$  an L30. Man sieht deutlich den bi-exponentiellen Zerfall bei hohen Temperaturen, während bei tiefen Temperaturen eine Unterscheidung nur begrenzt möglich ist. b) Ergebnisse für die bi-exponentielle Anpassung an die Daten. Das  $T_2$  des Proteins ist bei hohen Temperaturen deutlich kürzer als das  $T_2$  des Wassers, während bei 200 K das  $T_2$  der Wasser- und Proteinprotonen in der gleichen Größenordnung liegen. Die Wasserdynamik folgt einem Arrhenius-Gesetz mit einer Aktivierungsenergie  $E_A = 19.4 \text{ kJ/mol}$ . Wasserstoffbrückbindungen haben eine typische Aktivierungsenergie von  $E_A \approx 18 \text{ kJ/mol}$

nähert sich mit sinkender Temperatur dem  $T_2$  des Proteins. Der Wasseranteil  $p_w$  am Hahn-Echo-Signal beträgt im gesamten Temperaturbereich  $p_w \approx 0.2$ .

Im nächsten Schritt wurden STE-Experimente im homogenen Feld bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, um die Austauschraten  $k_w$ ,  $k_p$ , sowie die Spin-Gitter-Relaxationsraten von Lysozym- und Wasserprotonen zu bestimmen. Anhand der Höhe der Stufe im Signalverlauf (Abb. 4.17) lässt sich der Anteil der Wasserprotonen  $p_w$  abschätzen. Auch hier ist der Wert  $p_w = 0.2$  konsistent mit dem Ergebnis aus den Hahn-Echo-Experimenten.

Die Temperaturabhängigkeit der STE-Abfälle zeigt, dass Spin Flip-Flop-Prozesse dominieren und chemischer Austausch eine untergeordnete Rolle spielt. Die Fitergebnisse der STE-Experimente im homogenen Feld an das Modell von Peschier (3.60) sind in Abb. 4.18 abgebildet. Wie in Abb. 4.18 (obere Grafik) zu erkennen ist, ergeben sich für das Protein kürzere Spin-Gitter-Relaxationszeiten im Vergleich zum  $T_1$  des Wassers. Beide Komponenten weisen ein sehr flaches  $T_1$ -Minimum auf. Die Austauschraten  $k_w$  und  $k_p$  steigen mit sinkender Temperatur bis  $T \approx 230 \text{ K}$  an (Abb. 4.18, untere Grafik). Das Verhältnis der Austauschraten  $k_w/k_p \approx 2.9$  bleibt dabei bis  $T \approx 230 \text{ K}$  konstant. Unterhalb  $T \approx 230 \text{ K}$  nimmt das Verhältnis sprunghaft zu, da  $k_p$  mit weiter sinken-



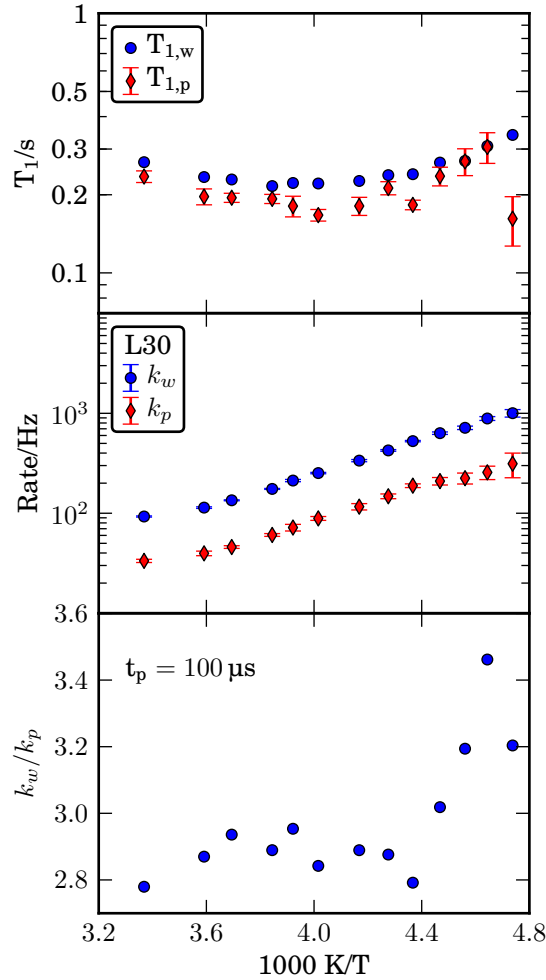
**Abb. 4.17.:** Der STE-Signalverlauf im homogenen Feld für verschiedene Temperaturen für die Probe L30. Man erkennt deutlich den beschleunigten Abfall mit *sinkender* Temperatur, was ein Hinweis auf effektivere Dipol-Dipol-Wechselwirkung aufgrund langsamerer Dynamik ist.

der Temperatur langsamer als  $k_w$  zunimmt. Dieser Effekt rührt von der Annäherung der Spin-Spin-Relaxationszeiten der Wasser- und Proteinprotonen zueinander, da zum Zeitpunkt des Echos der Anteil der Restmagnetisierung der Proteinprotonen am Gesamtsignal zunimmt (vgl. Abb. 4.16). Die Austauschraten entsprechen in etwa den typischen Werten für Wasser-Protein-Mischungen<sup>[115,128]</sup>.

Aus den Aminosäuresequenzen für Lysozym (3.2) erhält man ähnliche Werte für das Verhältnis  $k_w/k_p$ , siehe Tabelle 3.1.

### Lysozym und Wasser: Messungen im statischen Feldgradienten

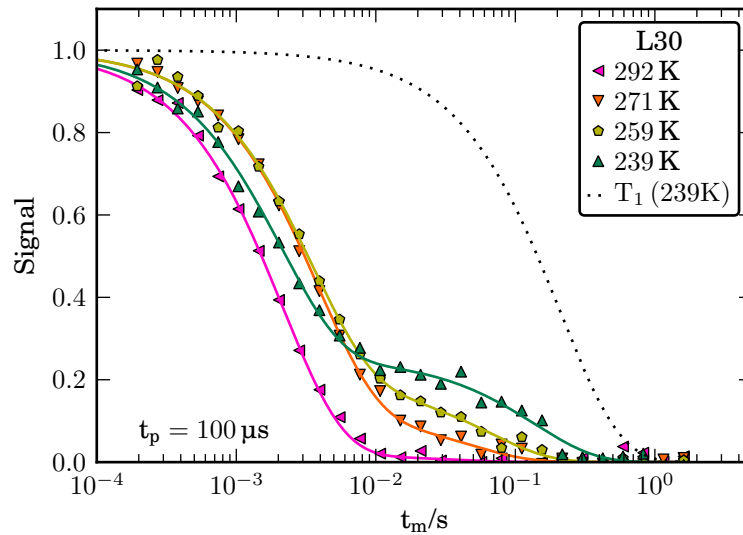
Wie bei der Myoglobinprobe, bestand der nächste Schritt darin, Diffusionskoeffizienten aus SFG-STE-Messungen zu bestimmen. Für die Lysozym-Wasser-Probe mit Hydratationsgrad  $h=0.3$  wurde in Abb. 4.19 für verschiedene Temperaturen das STE-Signal in Abhängigkeit von der Diffusionszeit  $t_m$  aufgetragen. Während für  $T = 292 K$  der Abfall durch Diffusion dominiert ist und durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden kann, zeigt das STE-Signal schon bei 271 K einen zwei-komponentigen Signalverlauf mit einer Stufe. Mit sinkender Temperatur steigt einerseits das Plateau an und andererseits wird der schnelle Abfall mit Abkühlung beschleunigt. Die durchgezogenen



**Abb. 4.18.:** Überblick über die Fitresultate der STE-Experimente. Das Verhältnis der Austauschraten  $k_w/k_p$  bleibt konstant, bis sie unter 230 K ansteigt. Der Grund für diesen Anstieg ist in der Annäherung der Spin-Spin-Relaxationszeiten der Wasser- und Proteinprotonen zu sehen.

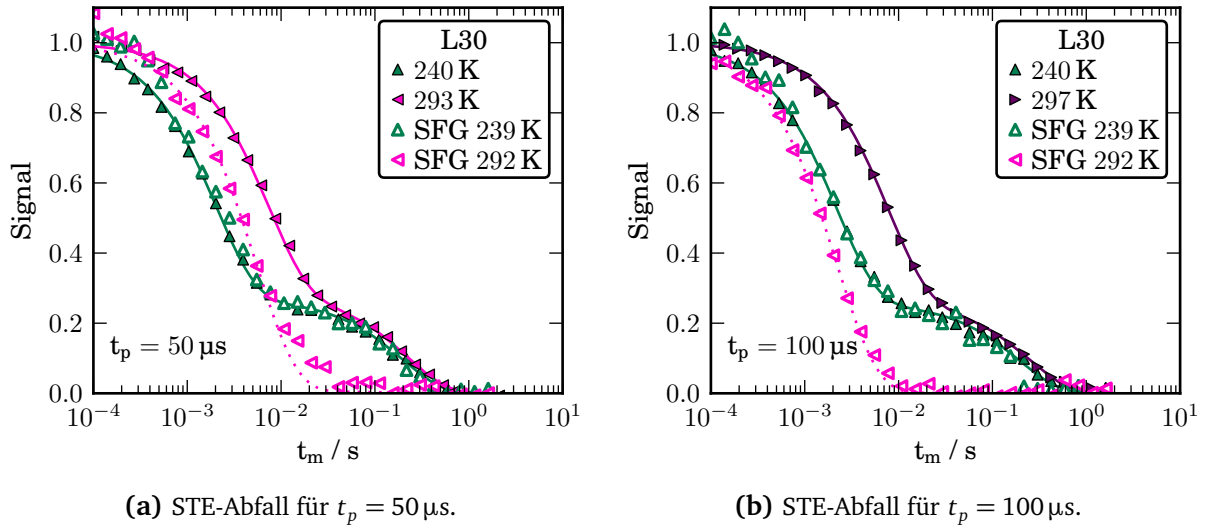
Linien in Abb. 4.19 sind Fits an das Modell von Peschier wobei die Parameter  $k_w$ ,  $k_p$  sowie  $T_{1,w}$  und  $T_{1,p}$  im homogenen Feld bestimmt wurden (Abb. 4.18) und bei der Anpassung festgehalten wurden.

In Abb. 4.20 ist der Vergleich der SFG-Daten mit den Daten aus dem homogenen Feld für zwei Evolutionszeiten  $t_p = 50 \mu\text{s}$  (a) und  $t_p = 100 \mu\text{s}$  (b) bei zwei Temperaturen gezeigt. Für  $T = 292 \text{ K}$  ist der Abfall durch Diffusion klar vom Einfluss der Kreuzrelaxation getrennt, für  $t_p = 100 \mu\text{s}$  fällt das Signal um einen Faktor 4 schneller ab, wie durch die  $q^2$ -Abhängigkeit des Signals für Diffusion zu erwarten ist. Für  $T = 240 \text{ K}$  ist kein Diffusionskoeffizient mehr bestimmbar.

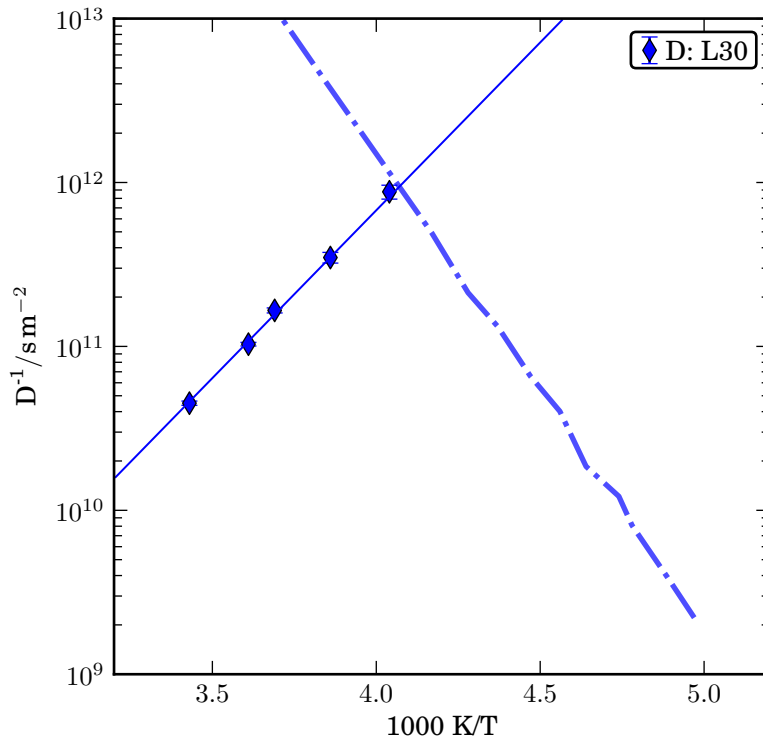


**Abb. 4.19.:** STE-Signal der Probe L30 im SFG für eine Evolutionszeit von  $t_p = 100 \mu\text{s}$ . Diffusionskoeffizienten lassen sich nur bis ca. 250 K bestimmen, bei tieferen Temperaturen dominiert der Abfall durch Kreuzrelaxation. Die durchgezogenen Linien sind Fits an das Modell von Peschier nach dem Auswerteprotokoll. Die gestrichelte Linie stellt den aufgrund von Spin-Gitter-Relaxation erwarteten Abfall dar.

In Abb. 4.21 sind die reziproken Diffusionskoeffizienten über  $1000\text{K}/T$  aufgetragen. Die durchgezogene Linie beschreibt eine Anpassung der Daten mit einer Arrhenius-Funktion.



**Abb. 4.20.:** Vergleich des Verlaufs von *identischen* STE-Experimenten im SFG (leere Symbole) sowie im homogenen Feld (volle Symbole) für L30 bei 293 K und 240 K. Bei  $T = 293$  K ist der Einfluss der Diffusion eindeutig erkennbar, der Abfall bei  $t_p = 100 \mu s$  ist ca. 4-mal schneller als bei  $t_p = 50 \mu s$ . Die gepunktete Linie ist ein Fit nach dem Peschier-Modell an die SFG-Daten. Unterhalb von  $T = 239$  K kann kein Diffusionskoeffizient mehr bestimmt werden.



**Abb. 4.21.:** Inverse Diffusionskoeffizienten aufgetragen über  $1000 K/T$ . Die gestrichelte Linie gibt die Grenze des Arbeitsbereichs an, bis zu der noch Diffusionskoeffizienten bestimmt werden können.

### 4.3. Kritik an veröffentlichten Daten

In beiden Veröffentlichungen von Mallamace et al. werden PFG-Hahn-Echo-Messungen bis 200 K gezeigt<sup>[29,30]</sup>. In der ersten Veröffentlichung beobachten die Autoren eine Änderung der Temperaturabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten von Wasser in MCM-41 Poren mit 2.4 nm Durchmesser bei  $T_x=223$  K und schließen daraus auf einen Fragil-Stark-Übergang<sup>[29]</sup>. Die PFG-Messungen unterhalb  $T_x$  wurden bei einem  $T_2$  des Wassers von  $< 200 \mu\text{s}$  und  $D < 1 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  durchgeführt.

Es ist illustrativ abzuschätzen welcher Signalverlust für ein Hahn-Echo-Experiment bei den angegebenen Werten zu erwarten ist. Mit für PFG optimistischen Annahmen, d.h. insbesondere Vernachlässigung der Schaltzeiten, verwendet man die Formel für Diffusion im statischen Feldgradienten mit  $t_p = \delta$  und  $g = G$ :

$$S/S_0 = \exp\left(-\frac{2}{3}\gamma^2 G^2 \delta^3 D\right) \quad (4.7)$$

Um noch Signal zu haben sollte nicht mehr als 99.3 % der Magnetisierung allein durch Spin-Spin-Relaxation zerfallen sein. Dies entspricht  $5 \cdot T_2$ , und ergibt für die maximale Länge  $t_p = \delta = 2.5 \cdot 200 \mu\text{s} = 450 \mu\text{s}$ . Mit der Annahme von typischen kommerziellen Gradientenstärken ( $G=30 \text{ T/m}$ ) erhält man somit einen Signalabfall durch Diffusion:

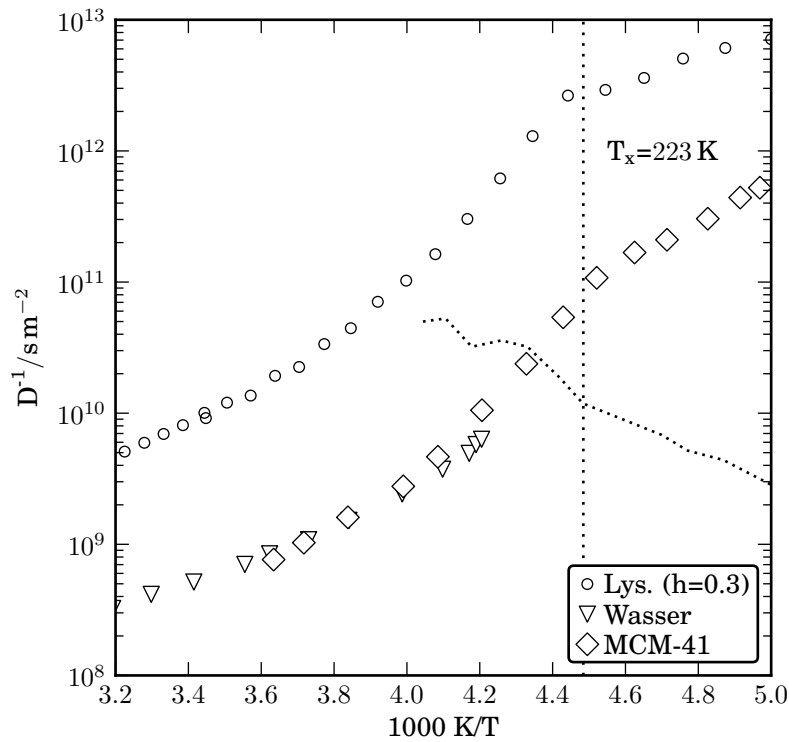
$$S/S_0 = \exp\left[-\frac{2}{3}\gamma^2 \cdot (30 \text{ T/m})^2 \cdot (450 \mu\text{s})^3 \cdot 1 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}\right] = 96 \% \quad (4.8)$$

d.h. das Signal fällt lediglich um 4 % ab.

Es ist fragwürdig, ob Diffusionskoeffizienten aus solch einem geringen Abfall zuverlässig bestimmt werden können. Da dies mit sehr optimistischen Annahmen abgeschätzt wurde, ist die Interpretation von Mallamace et al. mit äußerster Vorsicht zu bewerten. Insbesondere ist bekannt, dass bei starken gepulsten Gradienten diffusionsähnliche Signalabfälle durch *technische Ursachen* hervorgerufen werden können<sup>[105]</sup> (siehe Kapitel 3.4.3).

In einer weiteren Veröffentlichung von Mallamace et al.<sup>[30]</sup> werden PFG-Hahn-Echo-Daten an Lysozym mit Hydratationsgrad  $h=0.3$  vorgestellt, die ebenfalls eine Änderung der Temperaturabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten bei  $T_x=223$  K zeigen. Die Diffusionskoeffizienten sind in diesem Fall eine Größenordnung kleiner als bei Wasser in





**Abb. 4.22.:** Diffusionskoeffizienten von Wasser in Lysozym<sup>[30]</sup> und MCM-41-Poren<sup>[29]</sup> sowie Bulkwasser<sup>[29]</sup> reziprok aufgetragen über  $1000\text{ K}/T$ . Die gepunktete Linie gibt den kleinsten Diffusionskoeffizienten für die MCM-41 Probe an, der bei gegebenem  $t_p = \frac{5}{2}T_2$  und  $G = 30\text{ T/m}$  zu einem Abfall der Hahn-Echo-Höhe durch Diffusion auf  $1/e$  führt.

MCM-41 Poren.

Die Ergebnisse aus beiden Veröffentlichungen sind in Abb. 4.22 im Vergleich zu Bulkwasser gezeigt. Die gepunktete Linie gibt den kleinsten Diffusionskoeffizienten für die MCM-41 Probe an, der bei gegebenem  $t_p = 5/2T_2$  und  $G = 30\text{ T/m}$  zu einem Abfall der Echo-Höhe durch Diffusion auf  $1/e$  führt. Die Spin-Spin-Relaxationszeit  $T_2$  wurde aus der Publikation<sup>[29]</sup> entnommen. Für das Wasser in Lysozym sind keine  $T_2$  angegeben, weshalb hier lediglich eine qualitative Abschätzung des kleinsten messbaren Diffusionskoeffizienten  $D$  gegeben werden kann. Aufgrund der langsameren Translationsdynamik sollte das  $T_2$  des Wassers in der Proteinmatrix kürzer als in der Silikatmatrix sein. Die Grenze des minimalen bestimmbaren Diffusionskoeffizienten sollte aus diesem Grund zu höheren  $D$  verschoben sein. Die Daten in der Veröffentlichung zu Wasser in Lysozym von Mallamace et al.<sup>[30]</sup> erscheinen unter diesen Umständen sehr fragwürdig und es besteht ein berechtigter Zweifel, ob ein Abfall aufgrund von Diffusion tatsächlich gemessen wurde.

## 4.4. Vergleich mit Resultaten für lokale Wasserdynamik

Es ist aufschlussreich die Daten aus dieser Arbeit mit Resultaten aus Untersuchungen mit Hilfe von lokalen Methoden (Neutronenstreuung,  $^2\text{H}$ -NMR, ...) zu vergleichen. Zunächst muss eine Relation zwischen dem Diffusionskoeffizienten  $D$  und den Korrelationszeiten  $\tau$  der lokalen Dynamik hergestellt werden. Die grundlegende Beziehung zwischen mittlerer quadratischer Verschiebung (MSD)  $\langle r^2 \rangle$  und Diffusionskoeffizient  $D$  liefert die Einstein-Gleichung:

$$\langle r^2 \rangle = 6Dt \quad (4.9)$$

Lokale Prozesse können durch Sprünge der Moleküle mit einer Sprungrate  $\Gamma = 1/t_c$  und einer Sprunglänge  $a$  beschrieben werden. Für einen Markov-Prozess ergibt sich als MSD aus diesen Sprüngen (Einstein-Smoluchowski-Formel):

$$\langle r^2 \rangle = \Gamma a^2 t \quad (4.10)$$

und damit:

$$D = \frac{\Gamma a^2}{6} \quad (4.11)$$

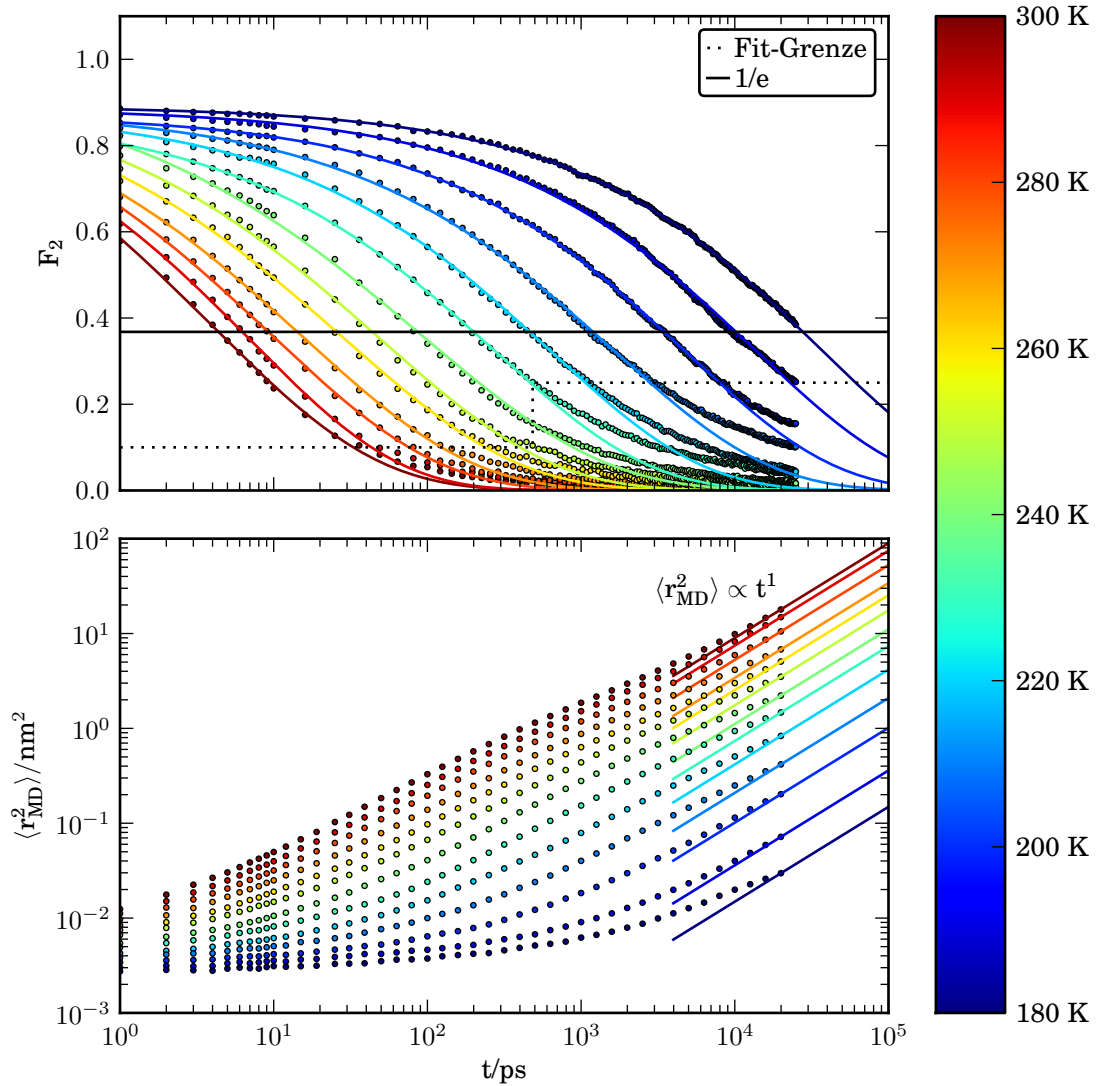
Normale Diffusion ist für ein Wassermolekül an einem Protein jedoch nicht zu erwarten, da das Protein ein Hindernis darstellt und die verfügbaren Pfade einschränkt. Um auf diesen geometrischen Obstruktionsparameter schliessen zu können, wurden Daten aus Molekulardynamische Simulationen von Wasser an Myoglobin zu Hilfe genommen. Da Molekulardynamische Simulationen die Trajektorien aller Teilchen beinhalten, kann die „echte“ mittlere quadratische Verschiebung durch Translation  $\langle r_{\text{MD}}^2 \rangle = 6D_{\text{MD}}t$  bestimmt werden, und mit den anhand der Einstein-Smoluchowski-Formel berechneten Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{ES}}$ :

$$D_{\text{ES}} = \frac{1}{6}\Gamma a^2 = \frac{1}{6\tau_c}a^2 \quad (4.12)$$

verglichen werden. Die Sprungrate  $\Gamma$  wird dabei mit der inversen Rotationskorrelationszeit  $\tau_c^{-1}$  identifiziert. Die Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  erhält man aus Molekulardynamischen Simulationen durch das Auswerten der Rotationsautokorrelationsfunktion  $F_2(t)$  des O-H-Bindungsvektors:

$$F_2(t) = \left\langle \frac{1}{2} \left[ 3 (\vec{e}_{\text{OH}}(0)\vec{e}_{\text{OH}}(t))^2 - 1 \right] \right\rangle \quad (4.13)$$

In diesem Fall bestimmt die mittlere Rate  $\langle \Gamma \rangle$  den Diffusionskoeffizienten<sup>[129,130]</sup>. In



**Abb. 4.23.:** Rotationsautokorrelationsfunktion  $F_2(t)$  (oben) des O-H-Verbindungsvektors von Wasser in Myoglobin und das mittlere Verschiebungsquadrat der Sauerstoff-Atome  $\langle r_{MD}^2 \rangle$  aus Molekular-Dynamik-Simulationen (unten). **Oberes Bild:**  $F_2$  zeigt einen gestreckt exponentiellen Verlauf, was auf eine Verteilung von Korrelationszeiten schließen lässt. Die durchgezogenen Linien sind Fits von  $F_{KWW}(t) = F_0 \exp(-(t/\tau_c)^\beta)$  an  $F_2(t)$  oberhalb der Fit-Grenze (gepunktete Linie). Die horizontale Linie zeigt den Schnittpunkt an bei der  $F_2$  auf  $1/e$  abgefallen ist. **Unteres Bild:**  $\langle r_{MD}^2 \rangle$  aufgetragen über der Zeit  $t$ . Die Simulationszeit ist bei Temperaturen  $T < 300$  K zu kurz um das erwartete Langzeitverhalten  $\langle r_{MD}^2 \rangle \propto t^1$  zu erreichen (durchgezogene Linien).

Abb. 4.23 (oben) sind Rotationskorrelationsfunktionen der O-H-Bindung aus Molekular-dynamischen Simulationen von Wasser an Myoglobin für verschiedene Temperaturen gezeigt. Die durchgezogenen Linien sind Fits an eine gestreckt exponentielle Funktion. Sie lassen auf eine Verteilung von Raten schließen<sup>[131]</sup>. Die genaue Verteilung der Raten

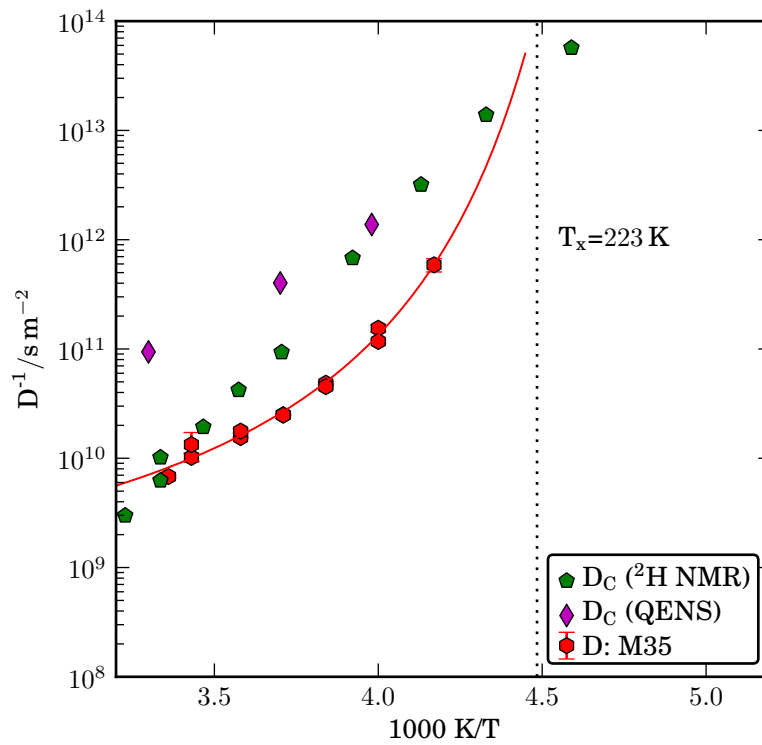
ist jedoch nicht bekannt, weshalb keine mittlere Rate  $\langle \Gamma \rangle$  angegeben werden kann:  $\langle \Gamma \rangle = \langle \tau_c^{-1} \rangle \neq \langle \tau_c \rangle^{-1}$ . Aus diesem Grund wird als Korrelationszeit für einen Elementarsprung die Zeit verwendet, bei der  $F_2(\tau)$  auf  $1/e$  abgefallen ist. Unter der Annahme einer Sprunglänge von  $a = 2.7 \text{ \AA}$  pro Elementarsprung (typ. Sauerstoff-Sauerstoff-Abstand im Wasser), lässt sich anhand Gl. 4.12 der Diffusionskoeffizient  $D_{\text{ES}}$  bestimmen.

Das mittlere Verschiebungquadrat  $\langle r_{\text{MD}}^2 \rangle$  ist in Abb. 4.23 (unten) über der Zeit  $t$  für verschiedene Temperaturen aufgetragen. Die Geraden geben den Verlauf von  $\langle r_{\text{MD}}^2 \rangle$  im Falle von freier Diffusion an. Wie zu erkennen ist, sind die Simulationszeiten für alle Temperaturen bis auf 300 K zu kurz um dem Langzeitverhalten  $\langle r_{\text{MD}}^2 \rangle \propto t^1$  für freie Diffusion zu folgen. Damit lässt sich ein Diffusionskoeffizient  $D_{\text{MD}}$  nur für 300 K bestimmen.

Das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{MD}}$  aus MD-Simulationen zu den nach Gl. 4.12 bestimmten  $D_{\text{ES}}$  beträgt  $D_{\text{ES}}/D_{\text{MD}} \approx 18$ , d.h. der tatsächliche Diffusionskoeffizient  $D_{\text{MD}}$  ist ca. 18-mal langsamer als der anhand durch lokale Dynamik erwartete Diffusionskoeffizient  $D_{\text{ES}}$ . Der Faktor  $c = 18$  spiegelt den Obstruktionsparameter wieder. Mit dieser Korrektur lassen sich nun effektive Diffusionskoeffizienten anhand Gl. 4.12 aus Korrelationszeiten von lokalen Methoden berechnen und mit Werten aus dieser Arbeit vergleichen:

$$D_C = D_{\text{ES}}/c \quad (4.14)$$

$D_C$  ist der mit  $c$  korrigierte Diffusionskoeffizient. In Abb. 4.24 ist der Diffusionskoeffizient  $D$  für das Wasser der M35-Probe im Vergleich zu  $D_C$  aus  $^2\text{H-NMR}^{[61]}$  und  $D_C$  aus Neutronenstreudaten<sup>[64]</sup> an Wasser in Myoglobinmatrix gezeigt. Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{ES}}$  anhand von Gl. 4.12 wurde eine Sprunglänge  $a = 2.7 \text{ \AA}$  angenommen, was dem Sauerstoff-Sauerstoff-Abstand in Wasser entspricht. Wie in Abb. 4.24 zu erkennen ist, unterscheidet sich der anhand lokaler Methoden bestimmte Diffusionskoeffizient erheblich. Der anhand von MD-Simulationen bestimmte Korrekturfaktor  $c$  kann sich aus mehreren Gründen vom tatsächlichen Obstruktionsparameter unterscheiden. Die Simulation wurde nur mit 4 Myoglobinproteinen durchgeführt, während sich das Wasser während der Feldgradienten-Messung aufgrund der längeren Diffusionszeit über deutlich mehr Proteine bewegt. Zusätzlich ist die Korrektheit der Annahme, dass jede Rotation auch einer Translation entspricht nicht gewährleistet.



**Abb. 4.24.:** Vergleich von berechneten Diffusionskoeffizienten  $D_C$  aus lokalen Methoden mit den hier bestimmten Diffusionskoeffizienten. Mit Hilfe der Einstein-Smoluchowski-Gleichung (4.10) kann ein Diffusionskoeffizient bestimmt werden, welcher geteilt durch einen Korrekturfaktor  $c = 18$  einen Vergleich mit  $D$  aus SFG-STE-Experimenten erlaubt (siehe Text auf Seite 84).



## 5. Zusammenfassung/Summary

### Zusammenfassung

In der hier vorgestellten Arbeit zur Translationsdiffusion von Wasser in Proteinmatrizen wurde gezeigt, dass bei der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten mit Hilfe von Stimulierter-Echo-Feldgradienten-NMR der Effekt der Kreuzrelaxation – der Austausch von Magnetisierung zwischen Wasser- und Proteinprotonen – einen nicht vernachlässigbaren Effekt darstellt. Das Modell von Peschier<sup>[78]</sup>, welches den Einfluss von Kreuzrelaxation und Diffusion auf den zeitlichen Verlauf der Magnetisierung beschreibt, wurde zunächst numerisch untersucht. Insbesondere wurden verschiedene typische Feldgradienten-Experimente zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten simuliert, um den Einfluss von Kreuzrelaxation auf die Auswertung zu zeigen. Die Ergebnisse belegen, dass einige Veröffentlichungen von Diffusionsmessungen mittels NMR entweder den Effekt der Kreuzrelaxation nicht beachten<sup>[71–73]</sup>, oder aber die Messungen an der Grenze des Arbeitsbereichs der Methode der gepulsten Feldgradienten-NMR (PFG-NMR) durchgeführt wurden<sup>[29,30]</sup>.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Protokoll entwickelt, um Stimulierte-Echo-(STE)-NMR-Messungen in starken statischen Feldgradienten (SFG) mit  $g \geq 180 \text{ T/m}$  auswerten zu können. Das Ziel der durchgeführten Messungen war, Aussagen über einen postulierten Fragil-Stark-Übergang des Hydrationswassers treffen zu können<sup>[30]</sup>, und die Verwendung von SFG-STE-Experimenten als Methode zur Untersuchung der Translationsdynamik von Wassermolekülen in der Hydratationsschicht von Proteinen zu etablieren.

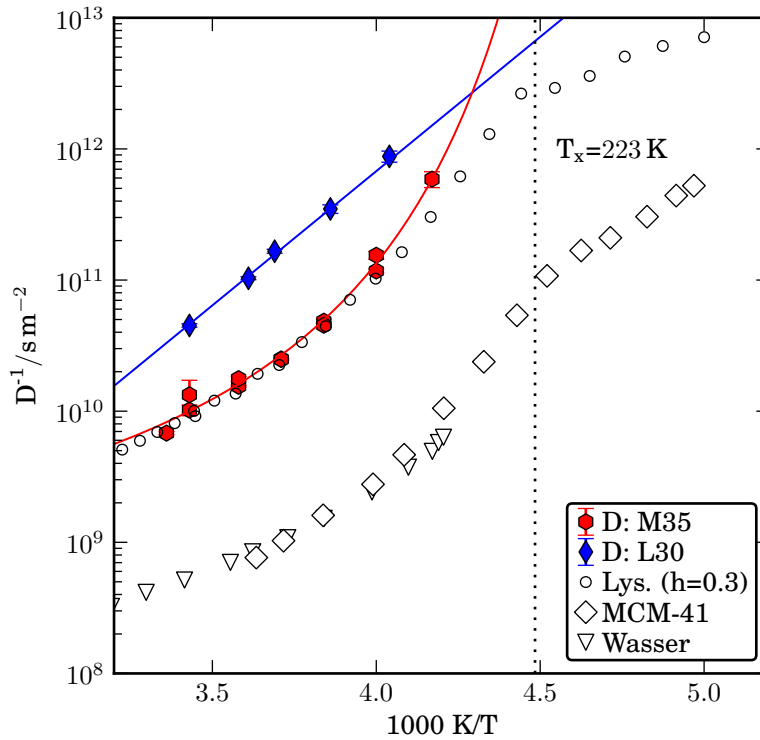
Weiterhin weist diese Arbeit explizit auf die Grenzen zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in niedrig-hydratisierten Wasser-Protein-Systemen anhand der SFG-STE-Methode hin. Es wurde gezeigt, dass es mit dieser Methode und den hier vorgestellten Proben *nicht* möglich ist, die langreichweitige Wasserdynamik in der Nähe des pos-

tulierten Fragil-Stark-Übergangs bei ca. 223 K zu untersuchen. Ein Problem stellt die Konkurrenz zwischen dem Abfall des STE-Signals durch Kreuzrelaxation und dem Abfall durch Diffusion dar. Während der Abfall des STE-Signals, hervorgerufen durch Diffusion, mit sinkender Temperatur langsamer wird, beschleunigt die Kreuzrelaxation den Abfall. Dadurch ist bei tiefen Temperaturen der Einfluss von Diffusion auf das STE-Signal zu klein, um einen Diffusionskoeffizienten zuverlässig bestimmen zu können. Der andere maßgebliche Faktor ist durch die Temperaturabhängigkeit der Spin-Spin-Relaxationszeiten der Wasser- und Proteinprotonen gegeben. Mit sinkender Temperatur nimmt durch Verlangsamung der Dynamik die Spin-Spin-Relaxationszeit  $T_2$  des Hydratationswassers ab und nähert sich dem  $T_2$  der Proteinprotonen an, wodurch zum Einen eine Trennung der beiden Komponenten erschwert wird, und zum Anderen das niedrige Signal-Rausch-Verhältnis nicht mehr durch häufigere Signal-Akkumulation für realistische Messzeiten verbessert werden kann. Während bei Wasser an Myoglobin die tiefste Temperatur für Diffusionsmessungen ca. 240 K beträgt, sind Diffusionsmessungen von Wasser an Lysozym schon unterhalb 250 K nicht mehr möglich.

Für die Hydratationswasserdynamik an Proteinen wurde für Myoglobin und Lysozym eine unterschiedliche Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten gefunden (siehe Abb. 5.1). Während der Diffusionskoeffizient  $D$  des Hydratationswassers an Myoglobin einem Vogel-Fulcher-Tammann-Verhalten folgt, kann  $D$  des Wassers an Lysozym durch einen Arrhenius-Verlauf beschrieben werden. Die Temperaturabhängigkeit von  $D$  des Wassers an Myoglobin entspricht bei hohen Temperaturen den veröffentlichten Daten von Wasser an Lysozym von Mallamace et al.<sup>[30]</sup>, jedoch mit einer stärkeren Temperaturabhängigkeit. Das Hydratationswasser der in dieser Arbeit verwendeten Lysozym-Probe hingegen diffundiert um eine Größenordnung langsamer als in den Literaturdaten von Mallamace et al.<sup>[30]</sup>. Der Grund für diese Diskrepanz konnte nicht abschließend geklärt werden, mutmaßlich unterscheiden sich die tatsächlichen Hydratationsgrade.

Anhand der gemessenen  $T_2$ -Werte von Wasser an Myoglobin und Lysozym konnte argumentiert werden, warum die Interpretation der Diffusionsdaten von Mallamace et al. mit Vorsicht zu betrachten ist. Obwohl der Effekt der Kreuzrelaxation bei den PFG-Hahn-Echo-Experimenten der Autoren keine Rolle spielt, scheinen die Messungen, besonders bei Temperaturen um den postulierten Fragil-Stark-Übergang, an der Grenze des Arbeitsbereiches der PFG-NMR durchgeführt worden zu sein. Diese Arbeit kann keinen Aufschluss geben, ob die von den Autoren gefundene Änderung der Temperaturabhän-





**Abb. 5.1.:** Inverse Diffusionskoeffizienten aufgetragen über der inversen Temperatur. Während Wasser der M35-Probe ein VFT-Verhalten zeigt, folgt Wasser in L30 einem Arrhenius-Gesetz. Offene Symbole sind Vergleichswerte aus der Literatur: Wasser in Lysozym<sup>[30]</sup> (Kreise), reines Wasser<sup>[30]</sup> (Dreiecke) und Wasser in MCM-41 (2.4 nm Durchmesser)<sup>[29]</sup> (Raute). Die gestrichelte Linie zeigt den postulierten Fragil-Stark-Übergang. Die Diskrepanz zwischen L30 und Literaturdaten ist evtl. auf unterschiedliche tatsächliche Hydratationsgrade zurückzuführen.

gigkeit bei  $T_x = 223$  K nur ein technischer Effekt ist, ob zwei unterschiedliche Prozesse dafür verantwortlich sind, oder ob es sich tatsächlich um einen Fragil-Stark-Übergang handelt.

Es sei mit Hinblick auf die Messungen von Wasser an Elastin (siehe Anhang) darauf hingewiesen, dass Wasser in globulären Proteinen mit einer niedrigen Glasübergangstemperatur  $T_g$ , wie Myoglobin und Lysozym mit  $T_g(h = 0.3) \approx 150 - 160$  K<sup>[33,132–136]</sup>, anscheinend eine schnellere Translationsdynamik als in Elastin mit einem höheren  $T_g(h = 0.3) \approx 293$  K<sup>[137]</sup> aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass auch das dynamische Verhalten der Matrix einen Einfluss auf die Dynamik der Hydratationshülle besitzt.

Die Frage, ob Wasser in Confinement das gleiche Verhalten zeigt wie in Bulk, ist noch immer offen<sup>[27]</sup>. Ein Hinweis für zumindest ähnliches Verhalten liefert ein Vergleich der Diffusionsdaten von Bulkwasser mit Wasser in MCM-41-Poren sowie Wasser in Prote-

inmatrizen in Abbildung 5.1. Der Temperaturverlauf der Diffusionskoeffizienten folgt für beide zuletzt genannten Proben dem gleichen Vogel-Fulcher-Tammann-Verhalten. Wasser an Proteinen diffundiert jedoch um mehr als eine Größenordnung langsamer als Bulkwasser. Inwiefern ein Obstruktionsfaktor aufgrund der Struktur der Wasser-Protein-Mischung für diese Verlangsamung verantwortlich ist, oder ob die Art und Weise der Wechselwirkung des Wassers mit der Proteinoberfläche zu diesem Verhalten der Dynamik führt, ist nicht geklärt.

Eine Möglichkeit den Effekt der Kreuzrelaxation zu unterdrücken, um dennoch SFG-STE-Experimente von Wasser in Proteinmatrizen bei Temperaturen  $T < 240\text{ K}$  durchführen zu können, wurde schon anhand der per-deuterierten C-Phycocyanin-Probe demonstriert (siehe Abb. 4.7). Es wäre für die Auswertung von Vorteil die Austauschraten  $k_w$  und  $k_p$  sowie  $T_{1,w}$  und  $T_{1,p}$  in einem separaten Experiment bestimmen zu können. Dazu bieten sich die von Edzes und Samulski<sup>[115]</sup> oder die von Peschier<sup>[78]</sup> genannten Inversion-Recovery- bzw. Goldman-Shen-Experimente<sup>[138]</sup> an.

## Summary

In this work the translational dynamics of hydration water in protein matrices is investigated. It was shown that the determination of diffusion coefficients of water in protein matrices with field gradient NMR is non-trivially influenced by the effect of cross relaxation, the exchange of magnetization between water and protein protons. The model of Peschier<sup>[78]</sup>, which describes how cross relaxation and diffusion affect the temporal evolution of the proton magnetization, was numerically solved. In order to elucidate the influence of cross relaxation on diffusion measurements, typical NMR field gradient experiments have been simulated. A protocol has then been developed in order to analyse and elicit diffusion coefficients in a reliable way out of data from stimulated echo (STE) NMR experiments in high ( $g \geq 180\text{ T/m}$ ) static field gradients (SFG). The findings show that either the effect of cross relaxation has been neglected in previous diffusion studies of hydration water<sup>[71–73]</sup> or that the diffusion measurements have been conducted at the limit of the working regime of the used method, the pulsed field gradient (PFG) NMR<sup>[29,30]</sup>. One goal of the present study was to test for the existence of the putative fragile-to-strong transition (FST) of supercooled hydration water at  $T_x = 223\text{ K}$ , and to establish the SFG-STE method for the study of translational dynamics of water in protein matrices.

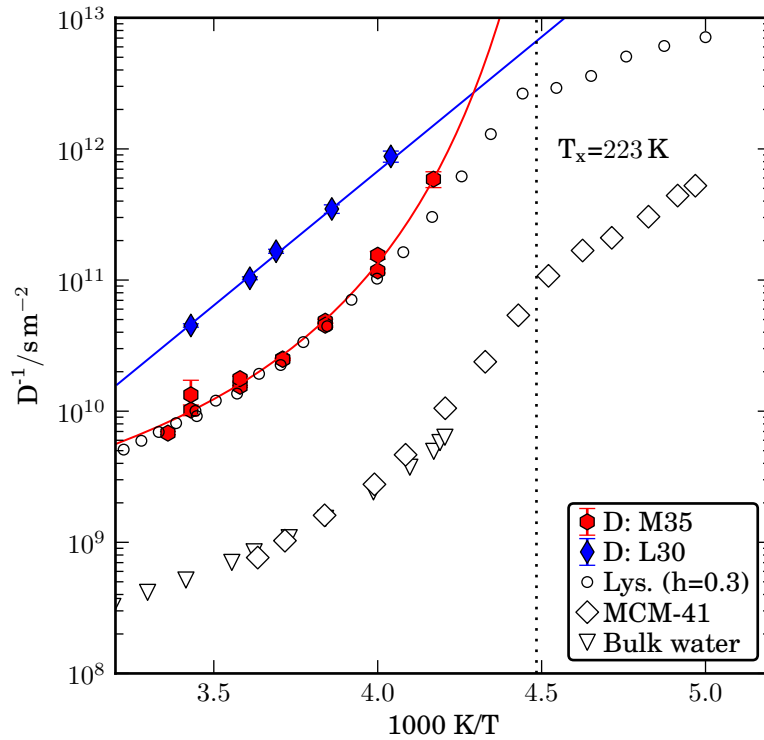
---

The present work devises explicitly the limit of the determination of diffusion coefficients of water in protein matrices. Evidence is given that it is not possible, using the samples and methods studied in this work, to study the translational dynamics in the vicinity of the temperature where a change of temperature dependence of  $D$  is found ( $T_x = 223\text{ K}$ ). One problem is the interference of the effects of cross relaxation and diffusion on the STE amplitude. Whereas the effect of diffusion on the STE amplitude decreases with lower temperatures, the loss of signal due to cross relaxation increases. Thus, the contrast between these two effects diminishes with lower temperatures and reliable determination of water diffusion coefficients  $D$  is deemed futile. In addition, the determination of  $D$  is further aggravated by the temperature dependence of the spin-spin relaxation times of water and protein protons ( $T_2$ ). The water  $T_2$  approaches the protein  $T_2$  with decreasing temperature, thus making it increasingly difficult to distinguish between both signal contributions. A derogatory side effect of the former fact is the reduction of the signal-to-noise ratio, rendering it unfeasible to collect data in a reasonable amount of time.

The results of the present work displayed in figure 5.2 lead to the following conclusions. The temperature dependence of the water in the lysozyme and myoglobin matrix differ by an order of magnitude. The faster water in myoglobin follows a Vogel-Fulcher-Tammann dependency, whereas the water in lysozyme shows Arrhenius behaviour. The myoglobin data is more or less in concordance with the published data of water in lysozyme<sup>[30]</sup>, at least for temperatures above  $T_x$ . The strong discrepancy of the presented lysozyme data to the literature data is not yet fully understood, but presumably due to differences in sample preparation.

Spin-spin relaxation data of water in myoglobin and lysozyme allow for the critical assessment of the literature data of Mallamace et al. and its interpretation in lieu of the postulated FST<sup>[29,30]</sup>. Despite the fact that cross relaxation is of no consequence for the PFG Hahn echo experiments performed by the authors, it is unclear whether the temperature dependence is indeed a FST, or if they are deluded by technical effects. Furthermore, the possibility exists that the temperature dependence is caused by two different processes of which one dominates at lower temperatures and vice versa.

It should be mentioned that, with respect to the results for water diffusion in elastin (see Appendix), it seems that water in globular proteins like myoglobin and lysozyme with lower glass transition temperature  $T_g(h = 0.3) \approx 150 - 160\text{ K}$ <sup>[33,132-136]</sup> diffuses faster than water in elastin which exhibits a higher  $T_g(h = 0.3) \approx 293\text{ K}$ <sup>[137]</sup>. From this



**Abb. 5.2.:** Inverse diffusion coefficients vs. inverse temperature. Water from the M35 sample shows a VFT behaviour, whereas water in L30 follows an Arrhenius law. Open symbols are values from literature data: water in lysozym (circles)<sup>[30]</sup>, water in MCM-41 pores with 2.4 nm diameter (triangles)<sup>[29]</sup>, and bulk water (diamonds)<sup>[29]</sup>. The dashed line indicates the temperature  $T_x$  of the putative fragile-to-strong transition. The discrepancy between literature lysozyme and data from this work is probably caused by a difference in the hydration levels due to differing sample preparations.

observation, it could be concluded, that the dynamic properties of the matrices influence the dynamic of the hydration shell.

The question whether water in confinement shows the same behaviour than bulk water is still left unanswered. An evidence for at least similar behaviour can be seen by comparing bulk water with water in MCM-41 or water in protein matrices, respectively. The temperature dependence of the diffusion coefficients of the latter two samples follows the same general Vogel-Fulcher-Tammann behaviour. Although, water in protein matrices diffuses about one order of magnitude slower. It is not clear whether this is caused by an obstruction factor due to the structur of the water-protein mixture or from the interaction of the water molecules with the protein surface.

It is imperative to suppress the influence of cross relaxation in order to conduct further SFG experiments of water in protein matrices below  $T = 240$  K. This suppression

---

of cross relaxation is successfully demonstrated on fully deuterated c-phycocyanin, see figure 4.7. It would be furthermore of great advantage for data analysis if the magnetization exchange rates  $k_w$  and  $k_p$ , as well as spin-lattice relaxation times  $T_{1,w}$  and  $T_{1,p}$  could be determined independently. Edzes and Samulski suggested special inversion-recovery experiments<sup>[115]</sup>, whereas Peschier<sup>[78]</sup> suggests Goldman-Shen type NMR experiments<sup>[138]</sup>.



# A. Anhang

## A.1. Tabelle der Aminosäuren

Aminosäure	Code	$N_H$	$N_{CH}$
Alanin	A	7	4
Cystein	C	7	3
Asparaginsäure	D	7	3
Glutaminsäure	E	9	5
Phenylalanin	F	11	7
Glycin	G	5	2
Histidin	H	9	4
Isoleucin	I	13	10
Lysin	K	13	8
Leucin	L	13	10
Methionin	M	11	7
Asparagin	N	8	3
Prolin	P	8	7
Glutamin	Q	9	4
Arginin	R	13	7
Serin	S	7	3
Threonin	T	9	5
Valin	V	11	8
Tryptophan	W	12	8
Tyrosin	Y	11	8

**Tab. A.1.:** Anzahl aller ( $N_H$ ) und der an C gebundenen ( $N_{CH}$ ) Protonen der 20 kanonischen Aminosäuren.

## A.2. Numerische Integration der gekoppelten Differentialgleichung des Modells von Peschier

Das System von gekoppelten Differentialgleichungen von Peschier wurde mit dem Python-Modul `scipy` numerisch integriert. Der wesentliche Teil des Programms ist in A.1 gezeigt. Durch Variation von  $q$ ,  $t_p$  und  $D$  wurde der Einfluss der Kreuzrelaxation untersucht.

**Listing A.1:** Wesentlicher Teil des Programs zur Simulation der Kreuzrelaxation mit Diffusion

```
# global variables
T1w = 1      # water T1 in s
T1p = 1.5    # protein T1 in s
kw = 200     # exchange rate of magnetisation from water to protein in Hz
kp = 150     # ditto but protein -> water

# define the coupled differential equations according to Peschier

def coupled_dgl(m, t, Dw, q):
    mw, mp = m
    # water magnetization, water diffuses
    mw_prime = -1/T1w*mw - kw*mw + kp*mp - Dw*q**2*mw
    # proton magnetization
    mp_prime = -1/T1p*mp - kp*mp + kw*mw
    return N.array([mw_prime, mp_prime])

# generate time points
t = N.logspace(-5, 1, 256)

#####
# simulate STE experiment: pi/2 - tp - pi/2 - tm -pi/2 -tp - aq #
# homogeneous field, g=0 T/m ; tp >> T2p                      #
#####
tp=200e-6      # interpulse distance between first and second pulse
T2w = 1e-3     # water T2 in s
T2p = 30e-6    # protein T2 in s
q = 2.675e8*0*tp # gamma and gradient
D=1e-11

# start condition at t=0 from theoretical values (Table 3.1)
mp_eq = 1.217
mw_eq = 0.673
# obey detailed balance for the magnetization exchange rates
kp = mw_eq*kw/mp_eq
```



```
# magnetization left after 2nd pi/2 pulse due to T2 relaxation
mp_start = mp_eq*N.exp(-tp/T2p)
mw_start = mw_eq*N.exp(-tp/T2w)

args = (D,q)
# start crossrelaxation
sig = I.odeint(coupled_dgl, [mw_start, mp_start], t, args=args)

# signal reduction after the last pi/2 pulse due to T2 relaxation
sig[:,0]*=N.exp(-tp/T2w)
sig[:,1]*=N.exp(-tp/T2p)

# sig contains full magnetization mw + mp
sig = sig.sum(axis=1)
```

### A.3. Tabellierte Diffusionskoeffizienten

T/K	$D_{\text{diff}}/1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$D_{\text{pesch}}/1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$D_{\text{diff}}/D_{\text{pesch}}$
250	$1.42 \pm 0.05$	$0.69 \pm 0.05$	2.06
260	$2.86 \pm 0.09$	$2.10 \pm 0.07$	1.36
270	$4.82 \pm 0.07$	$4.03 \pm 0.06$	1.20
280	$7.50 \pm 0.13$	$6.50 \pm 0.11$	1.15
291	$10.90 \pm 0.93$	$9.82 \pm 0.92$	1.11
298	$15.70 \pm 0.40$	$14.60 \pm 0.41$	1.08

(a) Tabellierte Werte von  $D_{\text{diff}}$  und  $D_{\text{pesch}}$  für  $t_p = 100 \mu\text{s}$ .

T/K	$D_{\text{diff}}/1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$D_{\text{pesch}}/1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$D_{\text{diff}}/D_{\text{pesch}}$
240	$0.43 \pm 0.02$	$0.18 \pm 0.02$	2.34
250	$1.08 \pm 0.03$	$0.86 \pm 0.03$	1.26
260	$2.43 \pm 0.09$	$2.22 \pm 0.09$	1.09
270	$4.25 \pm 0.08$	$4.04 \pm 0.08$	1.05
280	$5.93 \pm 0.25$	$5.66 \pm 0.24$	1.05
291	$7.77 \pm 2.18$	$7.50 \pm 2.18$	1.04

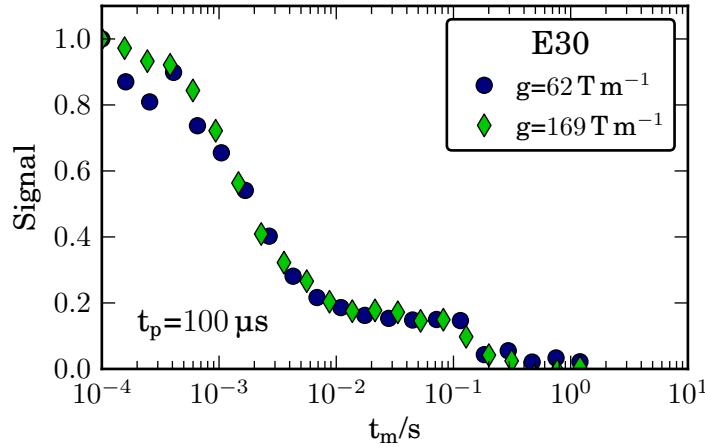
(b) Tabellierte Werte von  $D_{\text{diff}}$  und  $D_{\text{pesch}}$  für  $t_p = 200 \mu\text{s}$ .

**Tab. A.2.:** Diffusionskoeffizienten von Wasser in M35 bestimmt durch das Modell der normalen Diffusion ( $D_{\text{diff}}$ ) und dem Modell von Peschier ( $D_{\text{pesch}}$ ) für verschiedene  $t_p$  man erkennt die wachsende Diskrepanz mit fallender Temperatur. Dies ist zurückzuführen auf beschleunigte Kreuzrelaxation bei gleichzeitiger Verlangsamung der Diffusion bei tiefen Temperaturen. Für  $t_p = 200 \mu\text{s}$  fällt die Diskrepanz bei gleichen Temperaturen deutlich kleiner aus, da der Abfall durch Diffusion stärker betont wird.

## A.4. Elastinprobe E30

Zusätzlich zu den beschriebenen Messungen an M35 und L30 wurden auch Messungen an Elastin mit Hydratationsgrad  $h=0.3$  im statischen Feldgradienten mit  $g = 170 \text{ T/m}$  bei  $99.5 \text{ MHz}$  durchgeführt<sup>1</sup>. Es konnte jedoch bei  $270 \text{ K}$  keine Diffusion festgestellt werden (siehe Abb. A.1). Der Abfall im STE-Experiment durch Kreuzrelaxation ist bei dieser Probe mit ca.  $2 \text{ ms}$  besonders schnell, und limitiert den messbaren Bereich der Diffusionskonstanten. Als Abschätzung erhält man für die verwendeten Parameter im Experiment ( $t_p = 100 \mu\text{s}$ ,  $t_{m,\text{max}} = 2 \text{ ms}$ ,  $g = 170 \text{ T/m}$ ):

$$D_{\min} = \left( \gamma^2 g^2 t_p^2 \left[ \frac{2}{3} t_p + t_{m,\text{max}} \right] \right)^{-1} > 1.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s} \quad (\text{A.1})$$



**Abb. A.1.:** SFG-STE-Experiment mit zwei verschiedenen Gradienten an einer Elastin Probe mit Hydratationsgrad  $h=0.3$  bei  $270 \text{ K}$ . Die Unabhängigkeit des STE-Signals von der Gradientenstärke deutet daraufhin, dass Diffusion im SFG-STE-Experiments nicht beobachtbar ist. Der Diffusionskoeffizient von Wasser in Elastin muss daher unter der Beobachtungsgrenze  $D_{\min} < 1.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  liegen.

<sup>1</sup>Der Magnet hat im Laufe der Zeit mindestens zwei „soft quenches“ erfahren, welche die Feldstärke und damit auch den Gradienten erniedrigt haben. Elastin E30 war die erste gemessene Probe.



# Literaturverzeichnis

- [1] Cho, C. H., Singh, S., und Robinson, G. W.: Understanding All of Water's Anomalies With a Nonlocal Potential *The Journal of Chemical Physics*, 107(19): 7979–7988, 1997.  
[Zitiert auf S. 7]
- [2] Hauksbee, F.: An Account of an Experiment Touching the Different Densities of Common Water, From the Greatest Degree of Heat in Our Climate, to the Freezing Point, Observ'd by a Thermometer. By Mr. Fr. Hauksbee, F. R. S. *Philosophical Transactions*, 26(313-324):267–268, 1708.  
[Zitiert auf S. 7]
- [3] Angell, C. A.: Supercooled Water *Annual Review of Physical Chemistry*, 34(1): 593–630, 1983.  
[Zitiert auf S. 7]
- [4] Mpemba, E. B. und Osborne, D. G.: Cool? *Physics Education*, 4(3):172, 1969.  
[Zitiert auf S. 7]
- [5] Jeng, M.: The Mpemba Effect: When Can Hot Water Freeze Faster Than Cold? *American Journal of Physics*, 74(6):514–522, 2006.  
[Zitiert auf S. 7]
- [6] Katz, J. I.: When Hot Water Freezes Before Cold *American Journal of Physics*, 77(1):27–29, 2009.  
[Zitiert auf S. 7]
- [7] Vynnycky, M. und Mitchell, S.: Evaporative Cooling and the Mpemba Effect *Heat and Mass Transfer*, 46:881–890, 2010.  
[Zitiert auf S. 7]
- [8] Brownridge, J. D.: When Does Hot Water Freeze Faster Than Cold Water? a Search for the Mpemba Effect *American Journal of Physics*, 79(1):78–84, 2011.  
[Zitiert auf S. 7]
- [9] Carr, M. H., Belton, M. J. S., Chapman, C. R., et al.: Evidence for a Subsurface Ocean on Europa *Nature*, 391(6665):363–365, 1998.  
[Zitiert auf S. 8]

- [10] Schmidt, B. E., Blankenship, D. D., Patterson, G. W., et al.: Active Formation of “Chaos Terrain” Over Shallow Subsurface Water on Europa *Nature*, 479(7374): 502–505, 2011.  
[Zitiert auf S. 8]
- [11] Cwiling, B. M.: Sublimation in a Wilson Chamber *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 190(1020):137–143, 1947.  
[Zitiert auf S. 9]
- [12] Johari, G. P., Hallbrucker, A., und Mayer, E.: The Glass-Liquid Transition of Hyperquenched Water *Nature*, 330(6148):552–553, 1987.  
[Zitiert auf S. 9]
- [13] Stöckel, P., Weidinger, I. M., Baumgärtel, H., et al.: Rates of Homogeneous Ice Nucleation in Levitated H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O Droplets *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(11):2540–2546, 2005.  
[Zitiert auf S. 9]
- [14] Mishima, O. und Stanley, H. E.: The Relationship Between Liquid, Supercooled and Glassy Water *Nature*, 396(6709):329–335, 1998.  
[Zitiert auf S. 9]
- [15] Liu, L., Chen, S.-H., Faraone, A., et al.: Pressure Dependence of Fragile-To-Strong Transition and a Possible Second Critical Point in Supercooled Confined Water *Physical Review Letters*, 95:117802, 2005.  
[Zitiert auf S. 9, 18]
- [16] Xu, L., Kumar, P., Buldyrev, S. V., et al.: Relation Between the Widom Line and the Dynamic Crossover in Systems With a Liquid–Liquid Phase Transition *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46): 16558–16562, 2005.  
[Zitiert auf S. 9, 11, 18]
- [17] Richert, R.: Dynamics of Nanoconfined Supercooled Liquids *Annual Review of Physical Chemistry*, 62(1):65–84, 2011.  
[Zitiert auf S. 9]
- [18] Keir, J. und Fordyce, G.: On the Crystallizations Observed on Glass. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 66:530–542, 1776.  
[Zitiert auf S. 10]
- [19] Rehren, T. und Pusch, E. B.: Late Bronze Age Glass Production at Qantir-Piramesses, Egypt *Science*, 308(5729):1756–1758, 2005.  
[Zitiert auf S. 10]

- [20] Unkown: An Account of Some Experiments, Lately Made in Holland, Upon the Fragility of Unannealed Glass Vessels; Communicated to the President *Philosophical Transactions*, 43(472-477):505–516, 1744.  
[Zitiert auf S. 10]
- [21] Richert, R.: Physical Aging and Heterogeneous Dynamics *Physical Review Letters*, 104:085702, 2010.  
[Zitiert auf S. 10]
- [22] Ito, K., Moynihan, C. T., und Angell, C. A.: Thermodynamic Determination of Fragility in Liquids and a Fragile-To-Strong Liquid Transition in Water *Nature*, 398(6727):492–495, 1999.  
[Zitiert auf S. 11, 17]
- [23] Angell, C. A.: Insights Into Phases of Liquid Water From Study of Its Unusual Glass-Forming Properties *Science*, 319(5863):582–587, 2008.  
[Zitiert auf S. 11, 17, 18]
- [24] Mishima, O. und Stanley, H. E.: The Relationship Between Liquid, Supercooled and Glassy Water *Nature*, 396(6709):329–335, 1998.  
[Zitiert auf S. 11, 13]
- [25] Chen, S. H., Liu, L., Fratini, E., et al.: Observation of Fragile-To-Strong Dynamic Crossover in Protein Hydration Water *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24):9012–9016, 2006.  
[Zitiert auf S. 11, 20]
- [26] Doster, W., Busch, S., Gaspar, A. M., et al.: Dynamical Transition of Protein-Hydration Water, *Physical Review Letters*, 104(9):098101, 2010.  
[Zitiert auf S. 11]
- [27] Mattea, C., Qvist, J., und Halle, B.: Dynamics at the Protein-Water Interface From  $^{17}\text{O}$  Spin Relaxation in Deeply Supercooled Solutions *Biophysical Journal*, 95(6): 2951–2963, 2008.  
[Zitiert auf S. 11, 89]
- [28] Vogel, M.: Origins of Apparent Fragile-To-Strong Transitions of Protein Hydration Waters *Physical Review Letters*, 101:225701, 2008.  
[Zitiert auf S. 11, 18, 19]
- [29] Mallamace, F., Broccio, M., Corsaro, C., et al.: The Fragile-To-Strong Dynamic Crossover Transition in Confined Water: Nuclear Magnetic Resonance Results *The Journal of Chemical Physics*, 124(16):161102, 2006.  
[Zitiert auf S. 11, 18, 80, 81, 87, 89, 90, 91, 92]
- [30] Mallamace, F., Chen, S.-H., Broccio, M., et al.: Role of the Solvent in the Dynami-

- cal Transitions of Proteins: the Case of the Lysozyme-Water System *The Journal of Chemical Physics*, 127(4):045104, 2007.  
[Zitiert auf S. 11, 20, 74, 80, 81, 87, 88, 89, 90, 91, 92]
- [31] Mallamace, F., Corsaro, C., Baglioni, P., et al.: The Dynamical Crossover Phenomenon in Bulk Water, Confined Water and Protein Hydration Water *Journal of Physics: Condensed Matter*, 24(6):064103, 2012.  
[Zitiert auf S. 11]
- [32] Biman, B.: From Anomalies in Neat Liquid to Structure, Dynamics and Function in the Biological World *Chemical Physics Letters*, In Druck(0):–, 2012.  
[Zitiert auf S. 11]
- [33] Panagopoulou, A., Kyritsis, A., Aravantinou, A.-M., et al.: Glass Transition and Dynamics in Lysozyme–Water Mixtures Over Wide Ranges of Composition *Food Biophysics*, 6:199–209, 2011.  
[Zitiert auf S. 11, 89, 91]
- [34] Rosenstihl, M. und Vogel, M.: Static and Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance Studies of Water Diffusion in Protein Matrices *The Journal of Chemical Physics*, 135(16):164503, 2011.  
[Zitiert auf S. 11, 20]
- [35] Sinha, S. K. und Bandyopadhyay, S.: Dynamic Properties of Water Around a Protein–Dna Complex From Molecular Dynamics Simulations *The Journal of Chemical Physics*, 135(13):135101, 2011.  
[Zitiert auf S. 11]
- [36] Samouillan, V., Tintar, D., und Lacabanne, C.: Hydrated Elastin: Dynamics of Water and Protein Followed by Dielectric Spectroscopies *Chemical Physics*, 385(1-3):19 – 26, 2011.  
[Zitiert auf S. 11]
- [37] Lusceac, S. A., Rosenstihl, M., Vogel, M., et al.: NMR and Dielectric Studies of Hydrated Collagen and Elastin: Evidence for a Delocalized Secondary Relaxation *Journal of Non-Crystalline Solids*, 357(2):655–663, 2011.  
[Zitiert auf S. 11, 18]
- [38] Khodadadi, S., Roh, J. H., Kisliuk, A., et al.: Dynamics of Biological Macromolecules: Not a Simple Slaving by Hydration Water *Biophysical journal*, 98(7):1321–1326, 2010.  
[Zitiert auf S. 11]
- [39] Lusceac, S. A., Vogel, M. R., und Herbers, C. R.:  $^2\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Studies on the Temperature-Dependent Water and Protein Dynamics in Hydrated Elastin, Myo-



- globin and Collagen *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1804(1):41–48, 2010.  
[Zitiert auf S. 11, 18, 20]
- [40] Angell, C. A.: Formation of Glasses From Liquids and Biopolymers *Science*, 267(5206):1924–1935, 1995.  
[Zitiert auf S. 14]
- [41] Fulcher, G. S.: Analysis of Recent Measurements of the Viscosity of Glasses *Journal of the American Ceramic Society*, 8(6):339–355, 1925.  
[Zitiert auf S. 14]
- [42] Tammann, G. und Hesse, W.: Die Abhängigkeit der Viskosität von der Temperatur bei unterkühlten Flüssigkeiten *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 156(1):245–257, 1926.  
[Zitiert auf S. 14]
- [43] Vogel, H.: The Temperature Dependence Law of the Viscosity of Fluids, *Physikalische Zeitschrift*, 22:645, 1921.  
[Zitiert auf S. 14]
- [44] Goldstein, M.: Viscous Liquids and the Glass Transition: a Potential Energy Barrier Picture *The Journal of Chemical Physics*, 51(9):3728–3739, 1969.  
[Zitiert auf S. 15]
- [45] Stillinger, F. H.: A Topographic View of Supercooled Liquids and Glass Formation *Science*, 267(5206):1935–1939, 1995.  
[Zitiert auf S. 15]
- [46] Sastry, S., Debenedetti, P. G., und Stillinger, F. H.: Signatures of Distinct Dynamical Regimes in the Energy Landscape of a Glass-Forming Liquid *Nature*, 393(6685): 554–557, 1998.  
[Zitiert auf S. 15, 17]
- [47] Adam, G. und Gibbs, J. H.: On the Temperature Dependence of Cooperative Relaxation Properties in Glass-Forming Liquids *The Journal of Chemical Physics*, 43(1):139–146, 1965.  
[Zitiert auf S. 15]
- [48] Leutheusser, E.: Dynamical Model of the Liquid-Glass Transition *Physical Review A*, 29:2765–2773, 1984.  
[Zitiert auf S. 15]
- [49] Götze, W. und Sjögren, L.: Relaxation Processes in Supercooled Liquids *Reports on Progress in Physics*, 55(3):241, 1992.  
[Zitiert auf S. 15]

- [50] Cummins, H. Z.: The Liquid-Glass Transition: a Mode-Coupling Perspective *Journal of Physics: Condensed Matter*, 11(10A):A95, 1999.  
[Zitiert auf S. 15]
- [51] Angell, C. A., Ngai, K. L., McKenna, G. B., et al.: Relaxation in Glassforming Liquids and Amorphous Solids *Journal of Applied Physics*, 88(6):3113–3157, 2000.  
[Zitiert auf S. 15]
- [52] Richert, R.: Confinement Effects in Bulk Supercooled Liquids *The European Physical Journal - Special Topics*, 189:223–229, 2010.  
[Zitiert auf S. 16, 17]
- [53] Johari, G. P. und Goldstein, M.: Viscous Liquids and the Glass Transition. II. Secondary Relaxations in Glasses of Rigid Molecules *The Journal of Chemical Physics*, 53(6):2372–2388, 1970.  
[Zitiert auf S. 16]
- [54] Vogel, M. und Rossler, E.: Slow Beta Process in Simple Organic Glass Formers Studied by One- and Two-Dimensional  $^2\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance. I *The Journal of Chemical Physics*, 114(13):5802–5815, 2001.  
[Zitiert auf S. 16]
- [55] Davidson, D. W. und Cole, R. H.: Dielectric Relaxation in Glycerine *The Journal of Chemical Physics*, 18(10):1417–1417, 1950.  
[Zitiert auf S. 17]
- [56] Beckmann, P. A.: Spectral Densities and Nuclear Spin Relaxation in Solids *Physics Reports*, 171(3):85 – 128, 1988.  
[Zitiert auf S. 17]
- [57] Sastry, S., Debenedetti, P. G., Sciortino, F., et al.: Singularity-Free Interpretation of the Thermodynamics of Supercooled Water *Physical Review E*, 53:6144–6154, 1996.  
[Zitiert auf S. 17]
- [58] Wu, D. H., Chen, A. D., und Johnson, C. S.: An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 115(2):260–264, 1995.  
[Zitiert auf S. 18]
- [59] Limmer, D. T. und Chandler, D.: The Putative Liquid-Liquid Transition Is a Liquid-Solid Transition in Atomistic Models of Water *The Journal of Chemical Physics*, 135(13):134503, 2011.  
[Zitiert auf S. 18]

- [60] Gainaru, C., Fillmer, A., und Böhmer, R.: Dielectric Response of Deeply Supercooled Hydration Water in the Connective Tissue Proteins Collagen and Elastin *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(38):12628–12631, 2009.  
[Zitiert auf S. 18]
- [61] Lusceac, S. A. und Vogel, M.:  $^2\text{H}$  NMR Study of the Water Dynamics in Hydrated Myoglobin *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(31):10209–10216, 2010.  
[Zitiert auf S. 18, 20, 84]
- [62] Pawlus, S., Khodadadi, S., und Sokolov, A. P.: Conductivity in Hydrated Proteins: No Signs of the Fragile-To-Strong Crossover, *Physical Review Letters*, 100(10):108103, 2008.  
[Zitiert auf S. 18]
- [63] Swenson, J., Jansson, H., und Bergman, R.: Relaxation Processes in Supercooled Confined Water and Implications for Protein Dynamics *Physical Review Letters*, 96:247802, 2006.  
[Zitiert auf S. 18]
- [64] Doster, W., Cusack, S., und Petry, W.: Dynamical Transition of Myoglobin Revealed by Inelastic Neutron Scattering *Nature*, 337(6209):754–756, 1989.  
[Zitiert auf S. 19, 84]
- [65] Doster, W.: The Dynamical Transition of Proteins, Concepts and Misconceptions *European Biophysics Journal*, 37:591–602, 2008.  
[Zitiert auf S. 19]
- [66] Mamontov, E., O'Neill, H., und Zhang, Q.: Mean-Squared Atomic Displacements in Hydrated Lysozyme, Native and Denatured *Journal of Biological Physics*, 36:291–297, 2010.  
[Zitiert auf S. 19]
- [67] Zhang, Y., Lagi, M., Liu, D., et al.: Observation of High-Temperature Dynamic Crossover in Protein Hydration Water and Its Relation to Reversible Denaturation of Lysozyme *Journal of Chemical Physics*, 130(13):135101, 2009.  
[Zitiert auf S. 19]
- [68] Doster, W.: The Protein-Solvent Glass Transition *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1804(1):3–14, 2010.  
[Zitiert auf S. 19]
- [69] Doster, W.: The Two-Step Scenario of the Protein Dynamical Transition *Journal of Non-Crystalline Solids*, 357(2):622 – 628, 2011.  
[Zitiert auf S. 20]

- [70] Magazù, S., Migliardo, F., und Benedetto, A.: Puzzle of Protein Dynamical Transition *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(24):7736–7743, 2011.  
[Zitiert auf S. 20]
- [71] Knauss, R., Fleischer, G., Grunder, W., et al.: Pulsed Field Gradient NMR and Nuclear Magnetic Relaxation Studies of Water Mobility in Hydrated Collagen II, *Magnetic Resonance in Medicine*, 36(2):241–248, 1996.  
[Zitiert auf S. 21, 87, 90]
- [72] Knauss, R., Schiller, J., Fleischer, G., et al.: Self-Diffusion of Water in Cartilage and Cartilage Components as Studied by Pulsed Field Gradient NMR, *Magnetic Resonance in Medicine*, 41(2):285–292, 1999.  
[Zitiert auf S. 21, 87, 90]
- [73] Boutis, G., Renner, C., Isahkarov, T., et al.: High Resolution Q-Space Imaging Studies of Water in Elastin, *Biopolymers*, 87(5-6):352–359, 2007.  
[Zitiert auf S. 21, 87, 90]
- [74] Kimmich, R., Klammmler, F., Skirda, V., et al.: Geometrical Restrictions of Water Diffusion in Aqueous Protein Systems. a Study Using NMR Field-Gradient Techniques *Applied Magnetic Resonance*, 4:425–440, 1993.  
[Zitiert auf S. 21, 71, 72, 73]
- [75] Edzes, H. T. und Samulski, E. T.: Cross Relaxation and Spin Diffusion in the Proton NMR of Hydrated Collagen *Nature*, 265(5594):521–523, 1977.  
[Zitiert auf S. 21, 44, 63]
- [76] Campbell, I. D. und Freeman, R.: Influence of Cross-Relaxation on NMR Spin-Lattice Relaxation Times *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 11(2):143–162, 1973.  
[Zitiert auf S. 21]
- [77] Kalk, A. und Berendsen, H. J. C.: Proton Magnetic Relaxation and Spin Diffusion in Proteins *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 24(3):343–366, 1976.  
[Zitiert auf S. 21]
- [78] Peschier, L. J. C., Bouwstra, J. A., de Bleyser, J., et al.: Cross-Relaxation Effects in Pulsed-Field-Gradient Stimulated-Echo Measurements on Water in a Macromolecular Matrix *Journal of Magnetic Resonance, Series B*, 110(2):150–157, 1996.  
[Zitiert auf S. 21, 46, 61, 87, 90, 93]
- [79] Horstmann, M., Urbani, M., und Veeman, W. S.: Self-Diffusion of Water in Block Copoly(Ether-Ester) Polymers: an NMR Study *Macromolecules*, 36(18): 6797–6806, 2003.  
[Zitiert auf S. 21, 46]

- [80] Horstmann, M., Urbani, M., und Veeman, W. S.: NMR Study of Water Bound to Soft Segments in Thermoplastic Elastomers *Macromolecular Symposia*, 205(1): 129–142, 2004.  
[Zitiert auf S. 21, 46]
- [81] Abragam, A.: *Principles of Nuclear Magnetism* Oxford University Press, 2 edition, 1982.  
[Zitiert auf S. 25]
- [82] Poole, C. P. und Farach, H. A.: *Relaxation in Magnetic Resonance* Academic Press, 1971.  
[Zitiert auf S. 25]
- [83] Levitt, M. H.: *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance* John Wiley & Sons, Ltd, 2nd edition, 2008.  
[Zitiert auf S. 25]
- [84] Bloembergen, N., Purcell, E. M., und Pound, R. V.: Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption, *Physical Review*, 73(7):679–712, 1948.  
[Zitiert auf S. 28, 29]
- [85] Callaghan, P. T., Eccles, C. D., und Seymour, J. D.: An Earth's Field Nuclear Magnetic Resonance Apparatus Suitable for Pulsed Gradient Spin Echo Measurements of Self-Diffusion Under Antarctic Conditions *Review of Scientific Instruments*, 68 (11):4263–4270, 1997.  
[Zitiert auf S. 29]
- [86] Gädke, A.: Diffusionseffekte in Volumenselektiver NMR auf kleinen Längenskalen, Promotionsarbeit, Technische Universität Darmstadt, 2009.  
[Zitiert auf S. 29, 54, 55]
- [87] Hahn, E. L.: Spin Echoes, *Physical Review*, 80(4):580–594, 1950.  
[Zitiert auf S. 30, 36]
- [88] Callaghan, P. T.: *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy* Oxford University Press, OX2 6DP Oxford, United Kingdom, 2007.  
[Zitiert auf S. 33, 38]
- [89] Kimmich, R., Unrath, W., Schnur, G., et al.: NMR Measurement of Small Self-Diffusion Coefficients in the Fringe Field of Superconducting Magnets *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 91(1):136–140, 1991.  
[Zitiert auf S. 36]
- [90] Torrey, H. C.: Bloch Equations with Diffusion Terms, *Physical Review*, 104:563, 1956.  
[Zitiert auf S. 37]

- [91] Karlicek, Jr., R. F. und Lowe, I. J.: A Modified Pulsed Gradient Technique for Measuring Diffusion in the Presence of Large Background Gradients *Journal of Magnetic Resonance* (1969), 37(1):75–91, 1980.  
[Zitiert auf S. 37]
- [92] Galvosas, P.: PFG NMR-Diffusionsuntersuchungen mit Ultra-Hohen Gepulsten Magnetischen Feldgradienten an Mikroporösen Materialien Promotionsarbeit, University of Leipzig, 2003.  
[Zitiert auf S. 37, 38, 39, 42]
- [93] Sorland, G. H.: Short-Time PFGSTE Diffusion Measurements *Journal of Magnetic Resonance*, 126(1):146–148, 1997.  
[Zitiert auf S. 38]
- [94] Fleischer, G. und Fujara, F.: NMR as a Generalized Incoherent Scattering Experiment, In *NMR – Basic Principles and Progress*, volume 30, Seiten 161–202, 1994.  
[Zitiert auf S. 38]
- [95] Price, W. S.: Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance as a Tool for Studying Translational Diffusion: Part 1. Basic Theory *Concepts in Magnetic Resonance*, 9(5):299–336, 1997.  
[Zitiert auf S. 38]
- [96] Holz, M. und Weingartner, H.: Calibration in Accurate Spin-Echo Self-Diffusion Measurements Using  $^1\text{H}$  and Less-Common Nuclei *Journal of Magnetic Resonance* (1969), 92(1):115–125, 1991.  
[Zitiert auf S. 39]
- [97] Holz, M., Heil, S. R., und Sacco, A.: Temperature-Dependent Self-Diffusion Coefficients of Water and Six Selected Molecular Liquids for Calibration in Accurate  $^1\text{H}$  NMR PFG Measurements *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2 (4740 - 4742):3, 2000.  
[Zitiert auf S. 39]
- [98] Price, W. S. und Kuchel, P. W.: Effect of Nonrectangular Field Gradient Pulses in the Stejskal and Tanner (Diffusion) Pulse Sequence *Journal of Magnetic Resonance* (1969), 94(1):133–139, 1991.  
[Zitiert auf S. 41]
- [99] Geil, B.: Measurement of Translational Molecular Diffusion Using Ultrahigh Magnetic Field Gradient NMR *Concepts in Magnetic Resonance*, 10(5):299–321, 1998.  
[Zitiert auf S. 41, 42]
- [100] Chang, I., Hinze, G., Diezemann, G., et al.: Self-Diffusion Coefficients in Plastic

- Crystals by Multiple-Pulse NMR in Large Static Field Gradients *Physical Review Letters*, 76:2523–2526, 1996.  
[Zitiert auf S. 41, 43]
- [101] Chang, I.: NMR-Methoden Für Diffusionsuntersuchungen in Statischen Feldgradienten, Promotionsarbeit, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 1997.  
[Zitiert auf S. 41, 43]
- [102] Stejskal, E. O. und Tanner, J. E.: Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient *The Journal of Chemical Physics*, 42(1):288–292, 1965.  
[Zitiert auf S. 41]
- [103] Galvosas, P., Stallmach, F., Seiffert, G., et al.: Generation and Application of Ultra-High-Intensity Magnetic Field Gradient Pulses for NMR Spectroscopy *Journal of Magnetic Resonance*, 151(2):260–268, 2001.  
[Zitiert auf S. 42]
- [104] Galvosas, P., Stallmach, F., Seiffert, G., et al.: Overcoming Mechanical and Electronic Instabilities in Diffusion Measurements With Very High PFG-Intensities *Magnetic Resonance Imaging*, 19(3-4):575–575, 2001.  
[Zitiert auf S. 42]
- [105] Callaghan, P. T., Komlosh, M. E., und Nyden, M.: High Magnetic Field Gradient PGSE NMR in the Presence of a Large Polarizing Field *Journal of Magnetic Resonance*, 133(1):177–182, 1998.  
[Zitiert auf S. 42, 49, 80]
- [106] Zhang, W. und Cory, D. G.: Pulsed Gradient NMR Probes for Solid State Studies *Journal of Magnetic Resonance*, 132(1):144–149, 1998.  
[Zitiert auf S. 42]
- [107] Zhang, W. und Cory, D. G.: First Direct Measurement of the Spin Diffusion Rate in a Homogenous Solid *Physical Review Letters*, 80(6), 1998.  
[Zitiert auf S. 42, 43]
- [108] Stallmach, F., Galvosas, P., und Webb, G. A.: *Spin Echo NMR Diffusion Studies*, volume 61, Seiten 51–131 Academic Press, 2007 ISBN 0066-4103.  
[Zitiert auf S. 42]
- [109] Fischer, D. M., Duwe, P., Indris, S., et al.: Tracer Diffusion Measurements in Solid Lithium: a Test Case for the Comparison Between NMR in Static and Pulsed Magnetic Field Gradients After Upgrading a Standard Solid State NMR Spectrometer *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 26(2):74–83, 2004.  
[Zitiert auf S. 42]

- [110] Gutsze, A., Masierak, W., Geil, B., et al.: On the Problem of Field-Gradient NMR Measurements of Intracrystalline Diffusion in Small Crystallites–Water in NaA Zeolites as an Example *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 28(2-4):244–249, 2005.  
[Zitiert auf S. 42, 61]
- [111] Lasič, S., Åslund, I., und Topgaard, D.: Spectral Characterization of Diffusion With Chemical Shift Resolution: Highly Concentrated Water-In-Oil Emulsion *Journal of Magnetic Resonance*, 199(2):166–172, 2009.  
[Zitiert auf S. 42]
- [112] Callaghan, P. T., Jolley, K. W., und Trotter, C. M.: Stable and Accurate Spin Echoes in Pulsed Field Gradient NMR *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 39(3): 525–527, 1980/6.  
[Zitiert auf S. 43]
- [113] Demco, D. E., Johansson, A., und Tegenfeldt, J.: Constant-Relaxation Methods for Diffusion Measurements in the Fringe Field of Superconducting Magnets *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 110(2):183–193, 1994.  
[Zitiert auf S. 43]
- [114] Chang, I., Fujara, F., Geil, B., et al.: New Perspectives of NMR in Ultrahigh Static Magnetic Field Gradients *Journal of Non-Crystalline Solids*, 172-174(Part 2):674 – 681, 1994.  
[Zitiert auf S. 43]
- [115] Edzes, H. T. und Samulski, E. T.: The Measurement of Cross-Relaxation Effects in the Proton NMR Spin-Lattice Relaxation of Water in Biological Systems: Hydrated Collagen and Muscle *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 31(2):207–229, 1978.  
[Zitiert auf S. 44, 63, 76, 90, 93]
- [116] Zimmerman, J. R. und Brittin, W. E.: Nuclear Magnetic Resonance Studies in Multiple Phase Systems: Lifetime of a Water Molecule in an Adsorbing Phase on Silica Gel *The Journal of Physical Chemistry*, 61(10):1328–1333, 1957.  
[Zitiert auf S. 44]
- [117] Hills, B.: The Proton Exchange Cross-Relaxation Model of Water Relaxation in Biopolymer Systems *Molecular Physics*, 76(3):489–508, 1992.  
[Zitiert auf S. 46]
- [118] Hills, B.: The Proton Exchange Cross-Relaxation Model of Water Relaxation in Biopolymer Systems *Molecular Physics*, 76(3):509–523, 1992.  
[Zitiert auf S. 46]
- [119] Grinberg, F. und Kimmich, R.: Surface Effects and Dipolar Correlations of



- Confined and Constrained Liquids Investigated by NMR Relaxation Experiments and Computer Simulations, *Magnetic Resonance Imaging*, 19(3-4):401–404, 2001.  
[Zitiert auf S. 51]
- [120] Brunner, E.: Residual Dipolar Couplings in Protein NMR *Concepts in Magnetic Resonance*, 13(4):238–259, 2001.  
[Zitiert auf S. 51]
- [121] Kramer, F., Deshmukh, M. V., Kessler, H., et al.: Residual Dipolar Coupling Constants: an Elementary Derivation of Key Equations *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 21A(1):10–21, 2004.  
[Zitiert auf S. 51]
- [122] Lee, B. und Richards, F.: The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility *Journal of Molecular Biology*, 55(3):379 – IN4, 1971.  
[Zitiert auf S. 52]
- [123] Connolly, M.: Solvent-Accessible Surfaces of Proteins and Nucleic Acids *Science*, 221(4612):709–713, 1983.  
[Zitiert auf S. 52]
- [124] Doster, W. und Settles, M.: Protein-Water Displacement Distributions *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1749(2):173–186, 2005.  
[Zitiert auf S. 53]
- [125] Gädke, A., Schmitt, C., Stork, H., et al.: DAMARIS – a Flexible and Open Software Platform for NMR Spectrometer Control, In *8th International Bologna Conference on Magnetic Resonance in Porous Media*, Seite 72, 2006.  
[Zitiert auf S. 54]
- [126] Mansfield, P. und Chapman, B.: Active Magnetic Screening of Coils for Static and Time-Dependent Magnetic Field Generation in NMR Imaging *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, 19(7):540–545, 1986.  
[Zitiert auf S. 56]
- [127] Rosenstihl, M.: Construction of a Pulsed Field Gradient NMR Spectrometer and Comparison With Static Field Gradient Systems, Diplomarbeit, 2006.  
[Zitiert auf S. 56]
- [128] Wise, W. B. und Pfeffer, P. E.: Measurement of Cross-Relaxation Effects in the Proton NMR of Water in Fibrous Collagen and Insoluble Elastin *Macromolecules*, 20(7):1550–1554, 1987.  
[Zitiert auf S. 76]
- [129] Diezemann, G., Sillescu, H., Hinze, G., et al.: Rotational Correlation Functions

- and Apparently Enhanced Translational Diffusion in a Free-Energy Landscape Model for the  $\alpha$  Relaxation in Glass-Forming Liquids, *Physical Review E*, 57:4398, 1998.  
[Zitiert auf S. 83]
- [130] Vogel, M., Brinkmann, C., Eckert, H., et al.: Silver Dynamics in Silver Iodide/-Silver Phosphate Glasses Studied by Multi-Dimensional  $^{109}\text{Ag}$  NMR *Physical Chemistry Chemical Physics*, 4(14):3237–3245, 2002.  
[Zitiert auf S. 83]
- [131] Lindsey, C. P und Patterson, G. D.: Detailed Comparison of the Williams–Watts and Cole–Davidson functions, *Journal of Chemical Physics*, 73:3348, 1980.  
[Zitiert auf S. 83]
- [132] Doster, W., Bachleitner, A., Dunau, R., et al.: Thermal Properties of Water in Myoglobin Crystals and Solutions at Subzero Temperatures *Biophysical journal*, 50(2):213–219, 1986.  
[Zitiert auf S. 89, 91]
- [133] Miyazaki, Y., Matsuo, T., und Suga, H.: Glass Transition of Myoglobin Crystal *Chemical Physics Letters*, 213(3–4):303–308, 1993.  
[Zitiert auf S. 89, 91]
- [134] Sartor, G., Mayer, E., und Johari, G. P: Calorimetric Studies of the Kinetic Unfreezing of Molecular Motions in Hydrated Lysozyme, Hemoglobin, and Myoglobin *Biophysical journal*, 66(1):249–258, 1994.  
[Zitiert auf S. 89, 91]
- [135] Ahn, J. S., Kitagawa, T., Kanematsu, Y., et al.: Glass Transition of Zn-Substituted Myoglobin Probed by Absorption and Site-Selective Fluorescence Spectroscopies *Journal of Luminescence*, 64(1–6):81–86, 1995.  
[Zitiert auf S. 89, 91]
- [136] Miyazaki, Y., Matsuo, T., und Suga, H.: Low-Temperature Heat Capacity and Glassy Behavior of Lysozyme Crystal† *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(33):8044–8052, 2000.  
[Zitiert auf S. 89, 91]
- [137] Samouillan, V., André, C., Dandurand, J., et al.: Effect of Water on the Molecular Mobility of Elastin *Biomacromolecules*, 5(3):958–964, 2004.  
[Zitiert auf S. 89, 91]
- [138] Goldman, M. und Shen, L.: Spin-Spin Relaxation in  $\text{LaF}_3$ , *Physical Review*, 144(1):321–331, 1966.  
[Zitiert auf S. 90, 93]

# Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



# Danke!

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung und Hilfe Vieler niemals zustande gekommen! Dafür bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Beteiligten.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Vogel, mir die Möglichkeit gegeben zu haben ein interessantes Themengebiet bearbeiten zu können. Besonders hilfreich war sein steter Drang nach Ergebnissen, was mir oft geholfen hat, den Blick auf das Wesentliche nicht zu verlieren.

Prof. Dr. Franz Fujara, bei dem ich die ersten beiden Jahre meiner Promotion war, danke ich ebenfalls für die Unterstützung und Hilfe während all dieser Zeit. Die Freiheiten, welche mir eingeräumt wurden haben maßgeblich zur Förderung meines Basteltriebs und damit zum Verständnis der NMR-Methode beigetragen.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Sorin Lusceac, dessen Unterstützung ich während meiner Promotion immer sicher war und der immer ein offenes Ohr und Ratschläge zur Lösung von physikalischen sowie technischen Problemen hatte.

Alexei Privalov möchte ich dafür danken pragmatische Lösungen auch für scheinbar unlösbare Probleme zu finden.

Allen anderen Mitgliedern der AG Vogel und Fujara die mich während der Promotion begleitet haben ebenfalls ein „Dankeschön!“. Das Arbeitsklima war immer toll und es hat großen Spass gemacht mit euch zusammenzuarbeiten.

Unseren Werkstätten und Gruppentechnikern schulde ich ebenfalls großen Dank, ohne ihre Mithilfe würde in der AG Fujara und AG Vogel kein Spektrometer funktionieren. Auch abstruseste Ideen, welche nur Physiker haben können, wurden verwirklicht. Frei nach dem Motto: „Schwieriges erledigen wir sofort, Unmögliches dauert etwas länger“.

Meiner Frau Angelica danke ich für die unermüdliche Unterstützung. Ich konnte mich immer voll und ganz auf dich verlassen. Besonders in den letzten Monaten habe ich viel von dir abverlangt. Vielen, vielen Dank dafür. Bei meinem Sohn Filip entschuldige ich mich für die letzten Monate, er hatte nicht viel von seinem Papa. Dennoch hat er mich immer wieder zum Lachen gebracht und mich mit Freude erfüllt.

Vielen Dank an meine Eltern, die während des ganzen Studiums immer hinter mir

---

standen und mich immer zum Weitermachen motiviert haben. Meiner Mutter und Schwiegermutter danke ich besonders für die unkomplizierte Unterstützung und Mithilfe bei der Betreuung von Filip während der letzten Wochen und Monate.

Zu guter Letzt danke ich Prof. Dr. Klaus Bethge für die jahrelange Begleitung während des Studiums.